

Aus dem Institut für molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Optimierung der „*stealth*“-Eigenschaften von
Perfluorkarbon-Nanoemulsionen im Hinblick auf ein
aktives Targeting von neutrophilen Granulozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Vanessa Rosentrit

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Temme

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Experimentelle Betreuung: Dr. rer. nat. Pascal Bouvain

Für meine Familie

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.” - Carl Sagan

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bildgebung spielt in der Medizin eine zentrale Rolle, da sie maßgeblich die Diagnose, Therapie und Prognose beeinflusst. Insbesondere die spezifische Darstellung von Entzündungsprozessen stellt weiterhin eine Herausforderung dar. Eine in der Klinik etablierte nicht-invasive Bildgebungsmodalität stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar, welche eine hervorragende Darstellung von Weichgeweben ermöglicht, aber keine ionisierte Strahlung benötigt. Die Detektion von Entzündungsprozessen mittels MRT ist bei Verwendung konventioneller anatomischer Bildgebungssequenzen nur eingeschränkt möglich. Jedoch stellt die Beladung von phagozytischen Immunzellen mit Perfluorkarbon-Nanoemulsionen in diesem Zusammenhang einen vielversprechenden Ansatz dar, da Fluor im menschlichen Körper nahezu nicht vorkommt und somit eine hochspezifische und nahezu hintergrundfreie Visualisierung mittels ^{19}F -MRT möglich ist. Bereits 2008 konnte Flögel et. al. im Mausmodell eines Myokardinfarktes durch intravenös injizierte Perfluorkarbon-Nanoemulsionen entzündliche Prozesse durch Aufnahme von Monozyten mittels kombinierter $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT darstellen. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der gezielten Bildgebung neutrophiler Granulozyten, da sie zu den ersten Immunzellen gehören, die in das inflammatorische Gewebe migrieren. Eine frühzeitige und spezifische Visualisierung dieser Immunzellpopulation eröffnet daher neue diagnostische Möglichkeiten.

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des Targetings von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) zur selektiven Darstellung von neutrophilen Granulozyten. Zum Targeting von neutrophilen Granulozyten wurde ein spezifisch an CD177 bindendes Peptid (hN-Peptid) an die PFCs gekoppelt. Zur Reduktion der unspezifischen Aufnahme durch Monozyten und Makrophagen wurden die PFCs zusätzlich entweder PEGyliert oder mit einem CD47 Peptid funktionalisiert. Die PEGylierung der PFCs führte zu einer verminderten unspezifischen Aufnahme, insbesondere in Monozyten und damit zu einer verbesserten Spezifität. Das aktive Targeting mittels hN-Peptid steigerte die Aufnahme in neutrophilen Granulozyten. Jedoch wurde durch zusätzliche PEGylierung nicht nur die unspezifische, sondern auch die spezifische Aufnahme reduziert. CD47 ist dafür bekannt ein „*don't eat me*“-Signal zu vermitteln. Die CD47 Funktionalisierung zeigte eine moderate Reduktion der monozytären Aufnahme bei gleichzeitig geringem Effekt auf neutrophile Granulozyten, wobei zudem eine donorspezifische Variabilität der SIRP α -Expression beobachtet wurde. Da SIRP α als Rezeptor für CD47 fungiert, könnte die Variabilität die unterschiedlich ausgeprägten Effekte der CD47-Funktionalisierung erklären. Eine Kombination aus CD47 und aktivem Targeting mittels hN-Peptid führte entgegen der Erwartung nicht zu einer weiteren Reduktion der monozytären Aufnahme. Stattdessen zeigte sich eine teilweise erhöhte Aufnahme in neutrophilen Granulozyten, was auf komplexe Wechselwirkungen der Modifikationen hinweist. Insgesamt liefern die Ergebnisse dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse zur Optimierung von PFC-Nanoemulsionen für die zellspezifische Bildgebung. Für die Zukunft bedarf es eine weitere Optimierung der Oberflächenmodifikation, um eine noch spezifischere und gezieltere Darstellung neutrophiler Granulozyten ermöglichen. Dies könnte in der Medizin langfristig zur Verbesserung der Diagnostik entzündlicher Erkrankungen beitragen.

SUMMARY

Imaging plays a central role in medicine, as it significantly influences diagnosis, therapy and prognosis. In particular, the specific visualization of inflammatory processes remains a major challenge. An established non-invasive imaging modality is magnetic resonance imaging (MRI) which provides excellent soft tissue contrast, but does not require ionizing radiation. However, the detection of inflammatory processes using conventional anatomical MRI sequences is limited. In this context, immune cells loaded with perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs) represent a promising approach, as fluorine is virtually absent in the human body, enabling specific and nearly background-free imaging using ^{19}F -MRI. In 2008, Flögel et al. demonstrated in a mouse model of myocardial infarction that inflammatory processes can be visualized using intravenously administered perfluorocarbon nanoemulsions, which are taken up by monocytes and detected via combined $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRI. The focus of this work was the targeted imaging of neutrophil granulocytes, as they are among the first immune cells to migrate into inflamed tissue. Early and specific visualization of this immune cell population therefore offers new diagnostic opportunities.

The aim of this study was to optimize the targeting of perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs) for the selective visualization of neutrophil granulocytes. For this purpose, a CD177-specific peptide (hN-peptide) was conjugated to the PFCs. To reduce the nonspecific uptake by monocytes and macrophages, the PFCs were additionally either PEGylated or functionalized with a CD47-peptide. PEGylation of PFCs led to a reduction in unspecific cellular uptake, particularly in monocytes, thereby improving specificity. Active targeting using neutrophil-specific hN-peptide enabled a selective increase in uptake by neutrophil granulocytes. However, additional PEGylation reduced not only unspecific but also specific uptake. CD47 is known to mediate a “don’t eat me”-signal. CD47-functionalization led to moderate reduction in monocyte uptake, while only minor effects were observed in neutrophils. Furthermore, a donor-dependent variability in SIRP α -expression was observed. As SIRP α functions as the receptor of CD47, this variability may explain the heterogeneity in the observed effects of CD47. Unexpectedly, a combination of CD47 and active targeting via hN-peptide did not lead to a further reduction in monocyte uptake. Instead, a partially increased uptake in neutrophil granulocytes was observed, suggesting complex interactions between the different surface modifications.

Overall, the results of this study provide important insights into optimization of PFC nanoemulsions for cell-specific imaging. Further refinement of surface modification strategies will be necessary to achieve more specific and targeted imaging of neutrophil granulocytes. In the long term, this approach may contribute to improve diagnostic strategies for inflammatory diseases in medicine.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AUC	area under the curve
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Chol-PEG	Cholesterol-Polyethylenglykol2000
CXCR1	CXC-chemokine motif 1
CXCR2	CXC-chemokine motif 2
CT	Computertomographie
DAMPs	danger-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DLS	Dynamic Light scattering, dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's Modifizierungen eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et. Al	et alteri
F	Fluor
FACS	fluorescent activated cell scanning/sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
h	Stunde
H₂O	Wasser
IL-	Interleukin
i.v	intravenös
L	Liter
M	Molarität
MACS	magnetic activated cell sorting

MAL-PFCs	Maleimid-Perfluorkarbon-Emulsion
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mol%	Molprozent
mM	Millimol
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Probenanzahl
NE	Nanoemulsion
NETs	nuclear extracellular traps
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Nm	Nanometer
o/w	Öl in Wasser
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphat buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen Emissionstomographie
PFCE	Perfluorkronether
PFCs	Perfluorkarbon - Nanoemulsion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PRR	pattern recognition receptor
ROS	reactive oxygen species
sec.	Sekunde
SPECT	Single-Photon Emissions Computertomographie
SPIO	small paramagnetic iron oxide
SPIT	Sterol-basierte-Post-Inerstions-Technik
SSC	Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle

TGF- β

transforming growth factor- β

TLR

toll-like-receptor

TNF- α

Tumor Nekrose Faktor

w/o

Wasser in Öl

xg

relative Zentrifugalkraft

z. B.

zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Leukodiapedese und Abwehrmechanismen von neutrophilen Granulozyten	4
Abb. 2: Übersicht Perfluorkarbonate	9
Abb. 3: PEG-Konformationen.....	12
Abb. 4: Schematische Darstellung der PEGylierung von PFCs	23
Abb. 5: Schematische Darstellung der PEGylierung von ^{hN} PFCs	24
Abb. 6: Schematische Darstellung von CD47-funktionalisierten ^{Mal} PFCs	25
Abb. 7: Schematische Darstellung von ^{CD47 hN} PFCs	26
Abb. 8: Schematische Darstellung des Workflows.....	27
Abb. 9: Charakterisierung der PFCs.....	31
Abb. 10: Vergleich der zellulären Aufnahme von PFCs und ^{MAL} PFCs	31
Abb. 11: Charakterisierung von PFCs und ^{PEG} PFCs	33
Abb. 12: Zelluläre Aufnahme von PFCs und ^{PEG} PFCs ex vivo	34
Abb. 13: Charakterisierung von ^{MAL} PFCs und ^{hN} PFCs	35
Abb. 14: Zeitkinetik der zellulären Aufnahme von ^{hN} PFCs ex vivo	36
Abb. 15: CD47 Expression auf der Zelloberfläche	37
Abb. 16: SIRP α Expression auf der Zelloberfläche	38
Abb. 17: Charakterisierung von ^{MAL} PFCs und CD47-gekoppelten ^{MAL} PFCs (^{CD47} PFCs) ..	39
Abb. 18: Zeitkinetik der zellulären Aufnahme von ^{CD47} PFCs	40
Abb. 19: AUC der zellulären Aufnahme von ^{CD47} PFCs durch Monozyten	40
Abb. 20: Charakterisierung ^{MAL} PFCs und Targeting-PFCs (^{CD47 hN} PFCs).....	41
Abb. 21: Zeitkinetik der zellulären Aufnahme von ^{CD47 hN} PFCs	42

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Entzündungsreaktion	1
1.2 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten bei entzündlichen Erkrankungen	2
1.3 Bildung von neutrophilen Granulozyten	6
1.4 Magnetresonanztomographie (MRT)	7
1.4.1 Grundlagen der Magnetresonanztomographie	7
1.4.2 Kontrastmittel für die MRT	7
1.4.3 ¹⁹F-MRT	8
1.5 Perfluorkarbonate	9
1.5.1 Nanoemulsionen	10
1.5.2 PFC-Nanoemulsionen in der ¹⁹F-MRT-Bildgebung	10
1.6 Oberflächenmodifikation und aktives Targeting von PFC-Nanoemulsionen	11
1.6.1 PEGylierung	11
1.6.2 CD47	13
1.6.3 Aktives Targeting	13
1.7 Zielsetzung	14
2. MATERIALIEN	15
2.1 Geräte und Apparaturen	15

2.2 Verbrauchsmaterial	16
2.3 Puffer und Medien	17
2.4 Chemikalien und Reagenzien	18
2.5 Antikörper	18
2.6 Targeting Liganden	19
2.7 Software	19
3. METHODEN	20
3.1 Herstellung und Charakterisierung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs)	20
3.1.1 Herstellung der Nanoemulsionen mittels Hochdruckhomogenisation	20
3.1.2 Charakterisierung der Nanoemulsionen	21
3.2 Modifikation von Nanoemulsionen	22
3.2.1 PEGylierung von PFCs mittels SPIT	23
3.2.2 Kopplung von NG2 an MAL-PFCs	24
3.2.3 hN-PFCs in Kombination mit einer PEGylierung	24
3.2.4 Herstellung einer CD47 Emulsion	24
3.2.5 hN-PFCs in Kombination mit dem CD47-Peptid	25
3.3 Humane Immunzellen aus Vollblut	26
3.3.1 Ethikvotum	26
3.3.2 Isolierung Immunzellen aus humanem Vollblut	26
3.4 Zelluläre Aufnahme der PFCs	26
3.4.1 Allgemeiner Versuchsablauf mit Zeitkinetik	26
3.4.2 Durchflusszytometrie	27
3.5 CD47 Expression	28
3.6 SIRPα (CD47-Rezeptor) Expression	29

4. ERGEBNISSE	30
4.1 Herstellung und Charakterisierung von PFCs und ^{MAL}PFCs	30
4.2 Einfluss des Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE auf die passive Aufnahme durch humane Immunzellen	31
4.3 PEGylierung von PFCs	32
4.3.1 Charakterisierung PEGylierter PFCs	32
4.3.2 Vergleich der passiven zellulären Aufnahme von PFCs und ^{PEG}PFCs ...	33
4.4 Aktives Targeting von humanen neutrophilen Granulozyten mittels Targeting-PFCs	34
4.4.1 Charakterisierung der hN-Targetingemulsionen	35
4.4.2 Zelluläre Aufnahme der Targetingemulsionen	35
4.5 CD47 Peptid	36
4.5.1 Vorkommen von CD47 auf der Zelloberfläche von Immunzellen	37
4.5.2 CD47 Rezeptor Expression auf der Zelloberfläche von Immunzellen	37
4.5.3 Oberflächenmodifikation von MAL-PFCs mittels eines CD47-Peptids ...38	
4.5.4 Charakterisierung der CD47–Targetingemulsionen	38
4.5.5 Zelluläre Aufnahme der CD47-Targetingemulsionen	39
4.5.6 Aktives Neutrophilentargeting in Kombination mit CD47	41
4.5.7 Charakterisierung der ^{CD47 hN}PFCs	41
4.5.8 Zelluläre Aufnahme der Targetingemulsionen	42
5. DISKUSSION	43
5.1 PFC-Eigenschaften beeinflussen die passive zelluläre phagozytische Aufnahme	44
5.2 PEGylierung von PFCs reduziert die unspezifische zelluläre Aufnahme	45
5.3 Gesteigerte gezielte zelluläre Aufnahme in neutrophile Granulozyten durch Targeting-Emulsionen	47
5.4. CD47 reduziert die zelluläre Aufnahme von Monozyten	48

5.5 Kombination von CD47 und aktivem Targeting führt zu komplexen Wechselwirkungen der Oberflächenmodifikation.....	50
5.6 Limitation und Ausblick	52
6. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	54

1. EINLEITUNG

1.1 Die Entzündungsreaktion

Eine Entzündungsreaktion ist eine immunologische Antwort des Körpers auf schädliche Reize, wie beispielsweise Infektionserreger, darunter Bakterien und Viren. Ziel der Immunantwort ist es, die schädlichen Auslöser zu eliminieren.

Die klassischen Merkmale einer akuten Entzündung sind Rubor, Tumor, Calor, Dolor und Functio laesa [1]. Im Gegensatz dazu verläuft eine chronische Entzündung über einen längeren Zeitraum und zeigt nicht immer die typischen Entzündungszeichen.

Entzündungsreaktionen können zum einen durch Mikroorganismen, im Sinne einer bakteriellen, viralen, parasitären oder fungalen Infektion ausgelöst werden. Diese Infektionen werden in der Regel durch sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) initiiert. Dabei handelt es sich um exogene Molekülstrukturen die spezifisch auf Pathogenen, wie beispielsweise Bakterien und Viren vorkommen, jedoch nicht auf körpereigenen Zellen [2].

Neben Infektionen können auch Traumata oder Ischämien Entzündungsreaktionen infolge des Gewebsschadens auslösen. Ein klassisches Beispiel für eine ischämische Entzündungsreaktion ohne Anwesenheit von Mikroorganismen stellt der akute Myokardinfarkt dar, hier kommt es durch den Sauerstoffmangel zum Untergang körpereigener Kardiomyozyten. In diesem Zusammenhang spricht man von einer sterilen Entzündung. Die geschädigten Herzmuskelzellen setzen sogenannte DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) frei. Diese Molekülstrukturen grenzen sich von den PAMPs ab, da es sich hierbei um endogene Moleküle handelt, die normalerweise intrazellulär lokalisiert sind und erst im Rahmen eines Zellschadens extrazellulär freigesetzt werden [3, 4]. Zu diesen zählen unter anderem ATP, Hitzeschockproteine (HSPs), und HMGB1 (*high mobility group box 1*). Diese Moleküle werden von PRRs (*pattern recognition receptors*), wie den TLRs (*toll-like receptors*) der Immunzellen erkannt und gebunden, wodurch die inflammatorische Signaltransduktion eingeleitet wird. In der Folge kommt es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3 sowie zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Die Zytokine führen zum Anlocken weiterer Immunzellen in das geschädigte Gewebe, sodass die Inflammation verstärkt wird [5, 6].

Die ersten Immunzellen die in das geschädigte Gewebe migrieren sind die neutrophilen Granulozyten, gefolgt von Monozyten, welche sich zu Makrophagen

differenzieren. Nach Einwanderung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten in den Entzündungsherd kommt es zur Phagozytose der abgestorbenen Zellen und zu einer weiteren Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren [7]. Im späteren Verlauf kommt es zum *Switch* der inflammatorischen M1-Makrophagen zu antiinflammatorischen M2-Makrophagen. Diese produzieren antiinflammatorische Zytokine wie IL10 und TGF- β und leiten so die Heilungsphase und Gewebereparatur ein [8, 9]. Gleichzeitig wird die Proliferation der Fibroblasten gefördert, welche zur Ausbildung des Narbengewebes notwendig ist [10, 11].

1.2 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten bei entzündlichen Erkrankungen

Neutrophile Granulozyten stellen beim Menschen mit einem Anteil von ungefähr 62% die größte Leukozytenpopulation im Blut dar [12]. Sie werden im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet und liegen einer streng regulierten Freisetzung in die Blutzirkulation. Daher befinden sich die meisten reifen neutrophilen Granulozyten noch im Knochenmark und werden erst bei Entzündungsreaktionen oder Infektionen vermehrt freigesetzt [13].

Rezeptoren wie CXCR2, G-CSFR und TLRs spielen eine zentrale Rolle bei der Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation im Rahmen von Entzündungsreaktionen [13, 14]. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) nehmen hierbei eine wichtige Funktion ein, da sie durch Erkennung von PAMPs und DAMPs die Entzündungsreaktion initiieren. Dies führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren, darunter CXCL2 und G-CSF. Chemokine wie CXCL1, CXCL2 und IL-8 werden im Rahmen von Entzündungsprozessen vermehrt freigesetzt und binden an den auf neutrophilen Granulozyten exprimierten Rezeptor CXCR2. Die Bindung führt zur Aktivierung chemotaktischer Signalwege, wodurch die neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark ins Blut und weiter zum Inflammationsherd wandern [15]. Der Granulozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor (G-CSF) reguliert nicht nur die Proliferation und Differenzierung neutrophiler Granulozyten, sondern fördert auch deren Mobilisierung aus dem Knochenmark [16]. Daher verschiebt G-CSF das Gleichgewicht der CXCR4 und CXCR2 vermittelten Signalwege zugunsten von CXCR2 [17]. CXCR4 fungiert als Gegenspieler von CXCR2 und ist wesentlich für die Retention der Neutrophilen im Knochenmark verantwortlich [18, 19]. Insbesondere

gealterte neutrophile Granulozyten exprimieren vermehrt CXCR4 und werden so im Knochenmark gehalten, um in Apoptose zu gehen [20].

Nach ihrer Freisetzung in die Blutzirkulation gelangen neutrophile Granulozyten schnell zum Entzündungsherd. Bereits zu Beginn der Inflammationsphase werden Zytokine wie Interleukine und Chemokine freigesetzt, die Zellen der angeborenen Immunabwehr anlocken [21, 22]. Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Leukozyten, die in das inflammatorische Gewebe migrieren, häufig bereits innerhalb der ersten Stunden nach einem schädigen Ereignis wie einer Ischämie [7]. Ein zentrales Chemokin in diesem Zusammenhang ist IL8, gefolgt von weiteren Zytokinen wie IL-6, IL-1 und TNF- α . Diese verstärken die Entzündungsreaktion, indem sie unter anderem die chemotaktische Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten fördern und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induzieren. Damit neutrophile Granulozyten den Inflammationsherd erreichen können, müssen sie zunächst die Gefäßwand überwinden und durch das Endothel migrieren. Dieser Prozess erfolgt über mehrere aufeinanderfolgende Schritte, beginnend mit der Stimulation der Endothelzellen durch die ausgeschütteten Zytokine, sodass Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin und ICAMs gebildet werden [13]. Diese Adhäsionsmoleküle interagieren dann mit P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) und L-Selektin, welche sich auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten befinden [23]. Zunächst kommt es über die Adhäsionsmoleküle zu einer leichten Bindung und zum Abbremsen der Neutrophilen entlang der Endothelwand, was auch als „*Rolling*“ bezeichnet wird. Darauf folgt eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten welche über die Bindung von PSGL-1 und L-Selektin über intrazelluläre Signalwege vermittelt wird. Mit weiterer Abnahme der Rollgeschwindigkeit kommt es zu festeren Bindungen zwischen den Neutrophilen und dem Endothel „*Arrest*“, hierfür sind vor allem Integrine wie CD11a/CD18 (LFA-1) verantwortlich, die mit ICAM-1 auf der Endotheloberfläche interagieren [24]. Im nächsten Schritt folgt die Migration der Neutrophilen durch das Endothel, welche parazellulär oder transzellulär erfolgen kann [13].

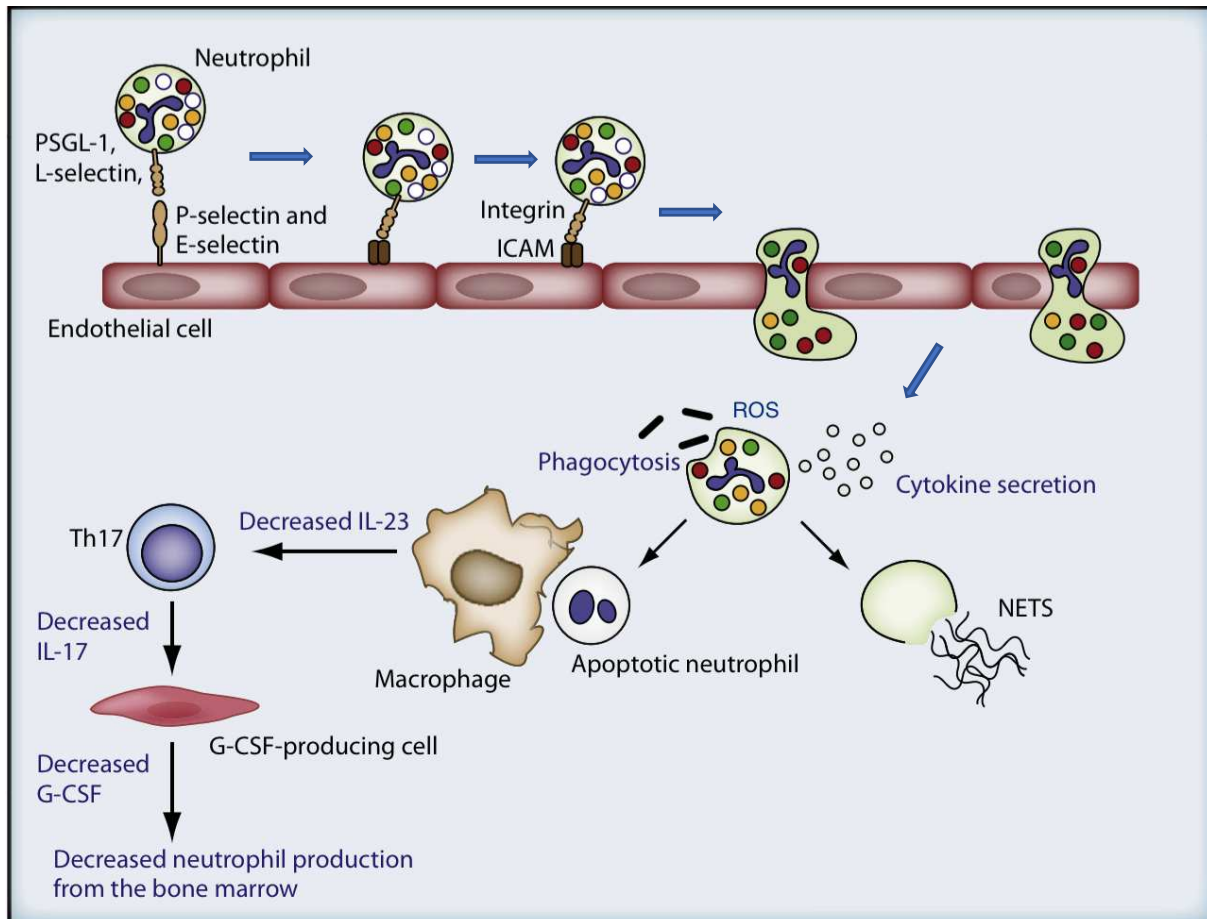


Abb. 1: Leukodiapedese und Abwehrmechanismen von neutrophilen Granulozyten

Im oberen Teil der Abbildung ist der Vorgang der Diapedese von Neutrophilen abgebildet. Zunächst kommt es über Selektine (PSGL-1, L-Selektin, P-Selektin und E-Selektin) zur Annäherung zwischen Neutrophilen und Endothel, gefolgt vom Rolling bis zur stärkeren Bindung durch Integrin und ICAM. Zum Schluss folgt die Transmigration durch das Endothel zum Gewebe. Im Gewebe entfalten aktivierte neutrophile Granulozytenen ihre Abwehrmechanismen, darunter die Phagozytose, die NETose sowie die Produktion und Freisetzung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Nach der Inflammation folgt die Reparatur über Apoptose von Neutrophilen durch Makrophagen, wodurch weniger inflammatorische Zytokine gebildet werden und auch die Neutrophilenproduktion reduziert wird. (Modifiziert nach Borregaard – Neutrophils, from Marrow to Microbes 2019)

Sobald die neutrophilen Granulozyten im Interstitium angekommen sind, folgen sie einem chemotaktischen Gradienten, um den Ort der Entzündung zu erreichen. Am Ort der Inflammation selbst wirken neutrophile Granulozyten über verschiedene Abwehrmechanismen [25].

Zu den wichtigsten Mechanismen zählen die Phagozytose, der oxidative Burst und die NETose. Bei der Phagozytose, werden Pathogene und Zelltrümmer, wie beispielsweise nekrotische Myokardzellen infolge eines Myokardinfarktes von den Neutrophilen ummantelt und in ihr Phagosom aufgenommen. Dieses verschmilzt

anschließend mit dem Lysosom zum Phagolysosom, dort erfolgt der enzymatische Abbau der Pathogene. Neben den lytischen Enzymen ist die NADPH-Oxidase ein wichtiger Bestandteil des Phagosoms [26]. Sie ist in der Membran des Phagolysosoms eingebettet und bildet reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Hier werden aus Sauerstoff Superoxidanionen gebildet. Dieser mit der Bildung von ROS assoziierter Abwehrmechanismus wird auch als oxidativer Burst bezeichnet [27]. Darüber hinaus können neutrophile Granulozyten sogenannte *nuclear extracellular traps* (NETs) bilden. Dieser Prozess ist aktuell noch nicht vollständig verstanden, es kommt dabei zur Ausbildung eines aus DNA-Fasern bestehenden Netzes, womit Pathogene eingefangen werden. Innerhalb der klebrigen Fasern sind Enzyme und antimikrobielle Granula eingelagert, die direkt zum Abbau der Pathogene führen [28, 29]. Neben diesen Abwehrmechanismen spielen neutrophile Granulozyten auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort. Sie setzen selbst Zytokine wie IL-8, IL-1 und $TNF-\alpha$ frei und tragen so zur weiteren Rekrutierung von Immunzellen bei [30, 31].

Neben den neutrophilen Granulozyten gehören auch $Ly-6c^{high}$ -Monozyten und M1-Makrophagen zu der initialen Inflamationsantwort. Ihre Ansammlung am Ort der Entzündung erfolgt unmittelbar nach den Neutrophilen. Die neutrophilen Granulozyten sorgen durch ihre Ausschüttung von Chemokinen, wie CCL-2 oder CCL-3 dafür, dass Monozyten angelockt werden und aus dem Blut ins Gewebe transmigrieren können [32]. M1-Makrophagen und $Ly-6c^{high}$ -Monozyten sind wichtig für die Beseitigung von Pathogenen und beschädigtem Gewebe. Des Weiteren wird durch die Neutrophilen auch die Zytokinproduktion von Makrophagen und Monozyten stimuliert [33]. Neutrophile Granulozyten kommunizieren noch mit vielen weiteren Immunzellen, wie natürlichen Killerzellen, Dendritischen Zellen und T-Zellen, um diese zu aktivieren und die Inflammation hochzuregulieren.

Zuletzt folgt die Apoptose der neutrophilen Granulozyten und der Entfernung des apoptotischen Zelldebris. Sie werden durch ihre „eat me“ Signale vor allem von Makrophagen phagozytiert. Mit Beginn der Apoptose von neutrophilen Granulozyten und der Entfernung von apoptotischen Neutrophilen wird die Auflösung der Inflammation und die Reparatur eingeleitet. Die Phagozytose der apoptotischen Zellen führt zu einer Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-10 und $TGF-\beta$ [34, 35]. Zudem kommt es zum Wechsel der Makrophagen vom pro-inflammatorischen Typ der M1-Makrophagen zu den anti-inflammatorischen Typ M2-Makrophagen.

Zusammenfassend spielen die neutrophilen Granulozyten eine zentrale Rolle sowohl in der Initiation als auch in der Auflösung von Entzündungsprozessen. Ihre Funktion im Rahmen der Heilung und Wiederherstellung von Gewebeschäden, beispielsweise nach einem Myokardinfarkt, wird in der Literatur jedoch etwas kontrovers diskutiert. Zum einen wird beschrieben, dass eine hohe Anzahl von neutrophilen Granulozyten mit schlechten klinischen Ergebnissen assoziiert sind, da es Korrelationen zwischen hoher Anzahl an Leukozyten und einer größeren Infarktgröße gibt [36, 37]. In einer anderen Studie gibt es Hinweise darauf, dass gerade ein Mangel von neutrophilen Granulozyten zu schlechteren Ergebnissen führt. Einerseits kommt es zu einer geringeren Aktivierung und Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen und andererseits findet eine gesteigerte Fibrose durch verstärkte Reparatoren statt. Es besteht die Annahme, dass die Entfernung von abgestorbenen Zellen bzw. geschädigtem Gewebe eine Voraussetzung für eine gute Heilung ist [38]. Dies deutet darauf hin, dass eine balancierte Regulation der neutrophilen Granulozyten entscheidend für eine effektive Heilung ist.

Aufgrund der hohen Relevanz von neutrophilen Granulozyten in Entzündungsprozessen ist auch ihre gezielte Darstellung in der Bildgebung von großer Bedeutung. Zur nicht-invasiven Visualisierung von Weichgewebe und inflammatorischen Veränderungen eignet sich die Magnetresonanztomographie (MRT) besonders gut.

1.3 Bildgebung von neutrophilen Granulozyten

Die Bildgebung von neutrophilen Granulozyten ist von großer Bedeutung, um ihre Rolle in Entzündungsprozessen besser zu verstehen und zu visualisieren.

Zu den konventionellen *in vitro* bildgebenden Verfahren gehören unter anderem die Durchflusszytometrie und die Immunhistochemie. Die Durchflusszytometrie ermöglicht qualitative und quantitative Merkmale von einzelnen Zellen und Zellpopulationen anhand spezifischer Marker zu messen. Die Immunhistochemie erlaubt eine gezielte Visualisierung, so lassen sich beispielsweise einzelne Zellen mittels Antikörper darstellen. Darüber hinaus stehen verschiedene molekulare bildgebende Verfahren zur Verfügung, wie der Magnetresonanztomographie (MRT), der Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT), der Positronen-Emissionstomographie (PET) und der intravitalen Mikroskopie (IVM). Diese Methoden erlauben eine *in vivo*

Bildgebung und zeigen wichtige Informationen über die Funktion und Dynamik der neutrophilen Granulozyten.

1.4 Magnetresonanztomographie (MRT)

1.4.1 Grundlagen der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein etabliertes, nicht-invasives bildgebendes Verfahren, das im klinischen Alltag für die Diagnostik eine zentrale Rolle einnimmt. Sie hat den großen Vorteil, dass im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren, wie der Computertomographie (CT) oder der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), keine ionisierende Strahlung verwendet wird. Dadurch ist die Methode risikoärmer für den Patienten.

Die MRT basiert auf der Detektion von Wasserstoffkernen (^1H), die im menschlichen Körper in großer Menge vorkommen. Die Wasserstoffprotonen werden mithilfe von Magnetfeldern und Radiowellen angeregt und erzeugen messbare Signale und bilden so die unterschiedlichen Protonendichten und ^1H -Relaxationseigenschaften des Gewebes ab. Aus den aufgenommenen Schnittbildern können dreidimensionale Datensätze rekonstruiert werden, wobei insbesondere das Weichgewebe sehr gut dargestellt werden kann. Entzündliche Prozesse können durch die konventionelle MRT nicht gut dargestellt werden, da entzündliche Prozesse in der Initialphase kaum sichtbar sind und die Immunzellen noch keine physikalischen Veränderungen verursachen, die sich in einem Gewebekontrast äußern [39].

1.4.2 Kontrastmittel für die MRT

Damit Gewebearten mit ähnlichen Protonendichten besser differenziert werden können, werden Kontrastmittel eingesetzt. Dabei unterscheidet man zwischen negativen und positiven Kontrastmitteln. Die Kontrastmittel für die MRT werden intravenös injiziert, dabei haben sie eine direkte Wirkung auf das umgebende Gewebe und werden nicht selbst bildlich dargestellt. Positive Kontrastmittel, wie Gadolinium-haltige Chelatkomplexe, führen zu einer Signalverstärkung, indem die T1-Zeit verkürzt wird. Die entsprechenden Strukturen erscheinen im Bild somit heller. Der Mechanismus dahinter basiert auf Wechselwirkungen zwischen den magnetischen Eigenschaften des Gadoliniums und den Wasserstoffatomen. Sie werden häufig zur Darstellung von Blutgefäßen und Tumoren verwendet und finden beispielsweise auch in der kardiologischen Bildgebung zur Darstellung von Infarkten Anwendung [40].

Negative Kontrastmittel, wie superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIO), haben den umgekehrten Effekt. Sie verkürzen die T2 Zeit durch Erzeugung eines störenden Magnetfeldes und führen so zu einer Signalabschwächung. Die entsprechenden Bereiche in dem Bild erscheinen dann dunkler. SPIOs werden in der Onkologie verwendet, um beispielsweise Lebertumore bildgebend darzustellen, da gesundes Lebergewebe SPIO aufnimmt, Tumorgewebe hingegen nicht [41].

Für die Bildgebung von Entzündungsprozessen sind diese Kontrastmittel leider nur eingeschränkt geeignet, weil Entzündungen zu unspezifischen Signalveränderungen in MRT-Aufnahmen führen und nicht gut abgrenzbar sind. Insbesondere SPIO führen zu einer starken und großflächigen Auslöschung von Signalen, sodass kein Rückschluss mehr auf die anatomischen Strukturen gemacht werden kann. Andererseits sind SPIOs sehr empfindlich und es können sehr wenige Zellen sichtbar gemacht werden.

Darüber hinaus wird die klinische Anwendung klassischer Kontrastmittel zunehmend kritisch diskutiert. Vor allem Gadolinium hat mehrere Nebenwirkungen, es kann in verschiedenen Organen, einschließlich des Gehirns, zu Ablagerungen kommen und steht im Zusammenhang mit der nephrogenen systemischen Fibrose [42, 43]. Daher besteht ein Bedarf an Kontrastmitteln, die spezifisch Entzündungszellen markieren und eine gezielte Darstellung von Inflammationsprozessen ermöglichen.

1.4.3 ^{19}F -MRT

Die ^{19}F -MRT stellt eine innovative Erweiterung der konventionellen MRT dar und ermöglicht die spezifische Darstellung von molekularen und zellulären Prozessen. Ein entscheidender Vorteil der ^{19}F -MRT ist, dass im menschlichen Organismus nahezu kein Fluor vorkommt und dadurch fluorhaltige Substanzen hochspezifisch und hintergrundfrei dargestellt werden können [44]. Die Kombination aus klassischer ^1H -MRT und der ^{19}F -MRT vereint ihre jeweiligen Vorteile. Durch die ^1H -MRT ist eine gute räumliche Auflösung möglich und die ^{19}F -MRT ermöglicht zusätzlich eine gezielte Visualisierung markierter Zellen. Die Überlagerung beider Signale ermöglicht dadurch eine präzise anatomische Lokalisation von Entzündungsprozessen. Für die Anwendung der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT sind fluorhaltige Kontrastmittel notwendig, dafür eignet sich die Anwendung von Perfluorkarbonen, welche eine Alternative zu den bekannten positiven Kontrastmitteln darstellt [45]. Bereits 2008 konnten Flögel et al. in einem Mausmodell eines akuten Myokardinfarktes zeigen, dass intravenös injizierte

Perfluorkarbone von zirkulierenden Monozyten aufgenommen werden die sich am Inflammationsherd angereichert haben, was mittels ^{19}F -MRT visualisiert werden konnte [46]. Die Kombination der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT mit Perfluorkarbonen stellt ein vielversprechendes Verfahren zur nicht-invasiven und zelltypspezifischen Darstellung von Entzündungsprozessen dar.

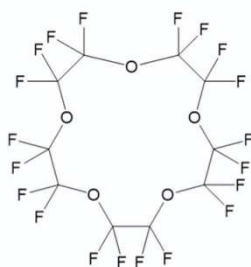
1.5 Perfluorkarbone

Perfluorkarbone sind vollständig mit Fluor substituierte Kohlenstoffverbindungen. Es macht sie besonders interessant, da sie durch ihren hohen Fluor-Gehalt mittels ^{19}F -MRT gut detektiert werden. Durch den fehlenden natürlichen Fluorhintergrund im menschlichen Körper sind die ^{19}F Signale hochspezifisch und hintergrundfrei. Selbst geringe Mengen können dadurch eindeutig quantifiziert werden [47, 48].

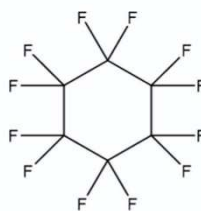
Ein großer Vorteil der Perfluorkarbone ist, dass sie nicht-toxische Eigenschaften haben und es zu keiner Radikalbildung kommt. Ihre chemische Inertheit und gute Biokompatibilität machen sie für den klinischen intravenösen Gebrauch als Kontrastmittel für die ^{19}F -MRT-Bildgebung interessant [49]. Dies ist hauptsächlich auf die hohe Stabilität der Kohlenstoff-Fluor-Bindung zurückzuführen, die nicht enzymatisch gespalten werden kann und somit eine Metabolisierung der Perfluorkarbone verhindert [50, 51]. Ein Nachteil der Perfluorkarbone ist ihre ausgeprägte Hydrophobie. Damit sie für die medizinische Anwendung nutzbar sind, werden sie in Form von Nanoemulsionen oder Nanopartikeln eingesetzt [52].

Es existieren verschiedene Perfluorkarbone, sie können lineare, zyklische oder verzweigte Strukturen haben, wobei die am häufigsten verwendeten Perfluorkarbone Perfluorkronether, Perfluorcyklohexan und Perfluoroktylbromid sind (Abb. 2).

Perfluorkronether



Perfluorzyklohexan



Perfluoroktylbromid

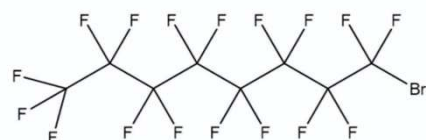


Abb. 2: Übersicht Perfluorkarbone

Abgebildet sind schematische Darstellungen von Perfluorkronether (links), Perfluorzyklohexan (mitte) und Perfluoroktylbromid (rechts).

In dieser Arbeit wurde Perfluor-15-kronen-5-ether verwendet, welches aufgrund seiner zyklischen Struktur und gleichmäßigen Fluoratomordnung besonders gut für die MR-Bildgebung geeignet ist.

1.5.1 Nanoemulsionen

Eine Emulsion beschreibt ein Gemisch aus zwei oder mehr normalerweise nicht mischbaren Phasen. Je nach Dispersionsmittel unterscheidet man zwischen Öl-in-Wasser (o/w) und Wasser-in-Öl (w/o) Emulsionen [53]. Für die Herstellung von Emulsionen sind ein Emulgator und Energie notwendig, da sich die Phasen ansonsten wieder trennen würden. Als Emulgator werden Moleküle mit einem amphiphilen Charakter verwendet, sie bestehen sowohl aus einem hydrophilen als auch aus einem lipophilen Molekülanteil [54]. Häufig verwendete Emulgatoren sind Phospholipide und Poloxamere.

In dieser Arbeit wurde Lipoid S75 als Emulgator verwendet. Die Herstellung der Nanoemulsionen kann entweder über das Hochenergie- oder das Niedrigenergie-Verfahren erfolgen. Das Hochdruckenergie-Verfahren macht sich mechanische Energie zu Nutze, um die beiden nicht mischbaren Flüssigkeiten zu emulgieren, wohingegen das Niedrigenergie Verfahren chemische Energie verwendet. Für die klinische intravenöse Anwendung ist es entscheidend, dass die Partikelgröße der Nanoemulsionen unter 200 nm liegt, um eine sichere Passage durch die Gefäße zu gewährleisten und das Risiko von Embolien zu minimieren [51].

1.5.2 PFC-Nanoemulsionen in der ^{19}F -MRT-Bildgebung

PFC-Nanoemulsionen werden wie klassische Kontrastmittel intravenös appliziert und gelangen so in die Blutbahn. Dort werden sie von phagozytisch aktiven Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten, aufgenommen. Im Rahmen von Inflammationsprozessen kommt es zu einer starken Akkumulation dieser Immunzellen im betroffenen Gewebe, wodurch die zuvor aufgenommen PFC-Nanoemulsionen an den Entzündungsherd gelangen [55-58]. Das ^{19}F -Signal der Perfluorkarbonate kann anschließend mit dem ^1H -Signal kombiniert werden, wodurch eine präzise Lokalisation der Entzündung möglich ist [59].

Das Besondere an dieser Methode ist die nicht-invasive Darstellung der Entzündungsprozesse, wie Myokardinfarkte oder Thrombosen. Die PFCs werden von verschiedenen Immunzellen aufgenommen, in dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Aufnahme durch neutrophile Granulozyten.

1.6 Oberflächenmodifikation und aktives Targeting von PFC-Nanoemulsionen

Durch eine gezielte Oberflächenmodifikation der PFC-Nanoemulsionen kann die spezifische Aufnahme der PFCs in ausgewählte Immunzellpopulation, insbesondere in den neutrophilen Granulozyten, gezielt beeinflusst werden. Dabei kommen unterschiedliche Ansätze zum Einsatz, die entweder der Reduktion der unspezifischen Aufnahme oder der gezielten Zelladressierung dienen. Sowohl die PEGylierung als auch die Funktionalisierung mit dem CD47-Peptid dienen der Optimierung der sogenannten „*stealth*“-Eigenschaften der PFC-Nanoemulsionen. Ziel dieser Modifikation ist es, die Partikeloberfläche gegenüber Monozyten und Lymphozyten abzuschirmen und so die unspezifische Phagozytose zu reduzieren. Im Gegensatz dazu ermöglicht ein aktives Targeting mittels neutrophilenspezifischen Peptids (hN) eine gezielte Steigerung der Aufnahme in neutrophile Granulozyten. Die Kombination dieser Ansätze zielt darauf ab, eine optimale Balance zwischen der Reduktion der unspezifischen Phagozytose und einer gezielten Steigerung der Aufnahme in neutrophilen Granulozyten zu erreichen.

1.6.1 PEGylierung

Die PEGylierung stellt eine Möglichkeit zur Oberflächenmodifikation dar, dabei wird Polyethylenglykol (PEG) in die Hülle der Nanoemulsion eingebaut. Das PEG kann zum einen während der Herstellung der PFCs durch Zugabe von DSPE-PEG zum Prä-Emulgat erfolgen. Alternativ kann eine PEGylierung nachträglich über Cholesterol-PEG, beispielsweise mittels Sterol-basierte-Post-Insertions-Technik (SPIT) hinzugefügt werden [60].

Die PEGylierung führt zu einer Abschirmung der PFC-Emulsion gegenüber phagozytisch aktiven Zellen und reduziert dadurch die unspezifische Aufnahme durch Immunzellen [61-65]. Die Effektivität der Abschirmung hängt vor allem von der Konzentration der PEGylierung ab, da diese die Konformation (siehe Abb. 3) der PEG-Ketten bestimmt. Bei niedrigen PEG-Konzentrationen gehen die PEG-Ketten eine Pilz-

Konformation ein, bei der die Ketten stark geknäuelnd sind und sich nahe der Emulsionsoberfläche befinden. Dies ist der Fall, wenn der Abstand zwischen zwei PEG-Ketten größer als ihr zweifacher Radius ($D > 2R$) ist. Die Bürsten-Konformation wird bei sehr hohen PEG-Konzentrationen erreicht, hier sind die PEG-Ketten nahezu gerade und dicht aneinander angeordnet. Der optimale Abschirmungseffekt wird zwischen beiden Konformationen erreicht, das entspricht einem Abstand kleiner als der doppelte Radius, aber auch nicht zu klein ist. In dieser Konformation sind die PEG-Ketten leicht gestaucht, also weder zu stark geknäuelnd noch zu starr, sondern sind flexibel genug die Interaktion und Bindung von Immunzellen abzufangen.

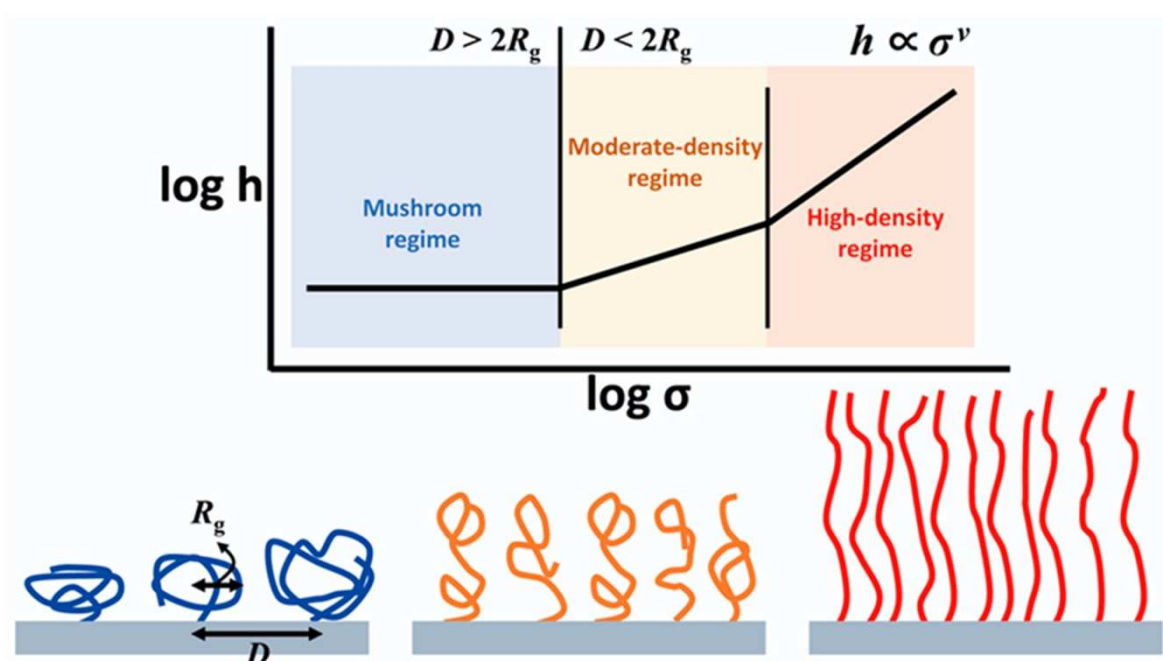


Abb. 3: PEG-Konformationen

In der Abbildung ist der Einfluss der PEG-Konzentration auf die Konformation dargestellt. Sobald der Abstand zwischen zwei PEG-Ketten größer als ihr doppelter Radius ist, liegt eine Pilz-Konformation vor. Bei zu hohen PEG-Konzentrationen und kleinen Abständen zwischen den PEG-Ketten liegt eine Bürsten-Konformation vor. Zwischen beiden Konformationen liegt die optimale PEG-Konzentration, in der der Abstand zwischen zwei PEG-Ketten unter dem doppelten Radius, jedoch nicht zu gering ist. (Modifiziert nach Gopalan et al. 2003)

1.6.2 CD47

CD47 (*cluster of differentiation 47*) ist ein Glykoprotein das erstmals 1990 beschrieben wurde, es ist auch bekannt als *integrin-associated Protein* (IAP) [66]. Es handelt sich um ein Transmembranprotein, welches von nahezu allen Zellen exprimiert wird. Es fungiert als sogenanntes „*don't eat me signal*“, weil es Zellen vor der Phagozytose schützt, wodurch körpereigene Zellen auch als körpereigen erkannt werden. Das CD47 interagiert mit SIRP-Proteinen, insbesondere die Interaktion des SIRP α Rezeptor auf Immunzellen mit CD47 wurde beschrieben [67]. Der SIRP α Rezeptor befindet sich primär auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen [68-70]. Durch die Interaktion von CD47 und dem SIRP α Rezeptor werden die Zellen von den myeloischen Zellen nicht phagozytiert [67].

Auch Tumorzellen nutzen diesen Mechanismus, indem sie verstärkt CD47 exprimieren und so über einen Immun-Escape-Mechanismus sich der Immunabwehr entziehen [71]. Genau die CD47-SIRP α Interaktion ist ein interessanter Angriffspunkt für Therapeutika in der Onkologie. Präklinische Studien konnten zeigen, dass die Inhibition der CD47-SIRP α Interaktion zu einer erhöhten phagozytischen Aktivität von Immunzellen führt [72-74].

1.6.3 Aktives Targeting

Neben der passiven Abschirmung durch Oberflächenmodifikationen, kann die Aufnahme der PFCs über ein aktives Targeting in bestimmte Zellen gezielt gesteuert werden [75, 76]. Dieses ist bei neutrophilen Granulozyten über die Kopplung eines spezifischen Neutrophilenpeptids möglich. Das in dieser Arbeit verwendete neutrophilenspezifische Peptid wurde 1999 von Mazzucchelli et al. mittels Phagendisplay identifiziert [77]. Es bindet selektiv an CD177, einen nahezu ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten exprimierten Oberflächenmarker [78, 79]. Diese spezifische Bindung soll die Internalisierung der PFCs fördern und eine zielgerichtete Aufnahme in neutrophile Granulozyten ermöglichen. Zusätzlich ist das Neutrophilenpeptid N-terminal mit Carboxyfluorescein fluoreszenzmarkiert, sodass die phagozytotische Aufnahme von funktionalisierten hN-PFCs durch Neutrophile mittels Durchflusszytometrie messbar ist.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es Perfluorkarbon-Nanoemulsionen so zu modifizieren, dass eine möglichst selektive Aufnahme in neutrophilen Granulozyten erreicht wird. Hierfür wurden unterschiedliche Methoden zur Oberflächenmodifikation untersucht, darunter die PEGylierung zur Reduktion der unspezifischen Phagozytose sowie die Funktionalisierung mit CD47. Zur gezielten Steigerung der phagozytischen Aufnahme in neutrophile Granulozyten wird ein aktives Targeting mittels spezifischen Neutrophilenpeptids verwendet. Ziel ist es diese Ansätze zu vergleichen und miteinander zu kombinieren, um eine möglichst hintergrundfreie und spezifische Darstellung von neutrophilen Granulozyten bei Entzündungsprozessen mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT zu ermöglichen. Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erteilte am 08.10.2018 ein positives Ethikvotum für die Studiennummer: 6194R.

2. MATERIALIEN

2.1 Geräte und Apparaturen

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller, Typenbezeichnung
Analysenwaage	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz), PA214
Autoklav	F. & M. Lautenschläger (Köln, Deutschland), 5169
Dispergiergerät (Ultra-Turrax)	IKA Werke (Staufen, Deutschland), T18
DLS-Analysegerät (<i>dynamic light scattering</i>)	Microtrac (Retsch GmbH, Haan, Deutschland), Nanotrac Wave II
Durchflusszytometer	BD Bioscience (San Jose, USA), FACSCanto™II
Eismaschine	Scotsman (Milan, Italy), AF20
Fluoreszenz-Messung	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), iBright FL1000
Hochdruckhomogenisator	Microfluidizer (Newton, USA), LV1
Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), HERAccl 150i
Magnetrührer	IKA Werke (Stufe, Deutschland), RCT basic
Mikrofluidizer	IKA Werke (Staufe, Deutschland), Ultra Turrax TP18/10
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland), 766 Calimatic
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Research
Schüttler	Edmund Bühler
Stauschlauch	Prämeta (Troisdorf, Deutschland)
Tube-Rotator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland), MACSmix™ Tube Rotator
Ultraschallbad	Bandelin (Berlin, Deutschland), Somorex RK 100 H

Vakuum-Absaugsystem	HCL (Pforzheim, Deutschland), AC 04
Vortexer	VWR International (Darmstadt, Deutschland) VWR International (Radnor, Pennsylvania; USA)
Zentrifugen	Hettich Zentrifugen (Tuttligen, Deutschland), Universal 320R Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), Heraeus Megafuge 16R Centrifuge Eppendorf (Hamburg, Germany), Centrifuge 5424R Beckman Coulter (Brea, USA), Allerga X-30R

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Well-Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
96-Well-Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Butterfly	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Butterflyaufsatz	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
EDTA-Röhrechen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Hautantiseptikum (Octenisept)	Schülke & Mayr GmbH (Niederstedt, Deutschland)
Heparin-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Parafilm	BEMIS (USA, Wisconsin)
Pipettenspitzen (100 µl, 200 µl, 500 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	B.Braun (Melsungen, Deutschland)

Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated (Corning, New York)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner-Bio-One (Frickenausen, Deutschland)

2.3 Puffer und Medien

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Medien

Puffer / Medien	Chemikalien oder Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose + 10 % FCS	Eigene Herstellung beinhaltet: - 450 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose - 50 ml FCS - 5 ml PenStrep Glutamax
Erythrozytenlysepuffer (pH = 7,4)	Hergestellt in der Zentralapothek der Universitätsklinik Düsseldorf, enthält pro ml: - 8,29 mg Ammoniumchlorid - 1,00 mg Kaliumhydrogencarbonat - 0,0375 mg Na-EDTA
FCS (Fetales Kälberserum)	Sigma Life Science (St. Louis, Missouri, USA)
MACS – Puffer	Eigene Herstellung beinhaltet: - 500 ml PBS - 2 mM EDTA - 0,5 % BSA
Phosphate-buffered saline (PBS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland): - 137 mM Natriumchlorid - 2,7 mM Kaliumchlorid - 10 mM Natriumdihydrogenphosphat - 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
PenStrep Glutamax (100X)	Gibco (Waltham, Massachusetts, USA)
Phosphat-Glycerol-Puffer (pH = 7,4)	Eigene Herstellung beinhaltet: - 1 mM Phosphat - 7 mM Dinatriumhydrogenphosphat - 3 mM Natriumdihydrogenphosphat - 2,5 % m/m Glycerol

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Atto 488-DPPE (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)	Atto-Tec GmbH (Siegen, Deutschland)
Atto 647-DPPE	Atto-Tec GmbH (Siegen, Deutschland)
Cholesterol-PEG ₂₀₀₀	Nanocs (USA)
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat (DHP)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DSPE-PEG ₂₀₀₀ (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglycol)-2000])	Avantilipids (USA, Alabama)
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Maleimid	Avantilipids (USA, Alabama)
Glycerol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Perfluor-15-kronen-5-ether	Fluorochem (Hadfield, UK)
Lipoid S75	Lipoid GmbH (Darmstadt, Deutschland)

2.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Reaktivität	Firma
CD14	PE-Cy7	63D3	Human	BioLegend
CD47	APC	B6H12	Human	BD Biosciences
CD172a/b	PE	SE5A5	Human	BD Biosciences

2.6 Targeting Liganden

Tabelle 6: Verwendete Peptide

Bezeichnung	Fluorochrom	Struktur	Hersteller
NG2	Carboxyfluorescein (FITC)	FAM-KQLSEMVTG-GGG	Genaxxon bioscience (Ulm, Deutschland)
CD47	Carboxyfluorescein (FITC)	FAM-GNYTCEVTELTREGETIIEIKGGGC	Genaxxon bioscience (Ulm, Deutschland)

2.7 Software

Die Versuchsergebnisse am Durchflusszytometer wurden mit FlowJo ausgewertet und im Anschluss mit Origin und Microsoft Excel 2022. Des Weiteren wurden Microsoft Word 2022 und Microsoft Powerpoint im Rahmen der Dissertation verwendet.

3. METHODEN

3.1 Herstellung und Charakterisierung von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Perfluorkarbon-Nanoemulsionen mittels eines Microfluidizers (LV1) nach dem Prinzip der Hochdruckhomogenisation hergestellt.

Die Herstellung der Präemulgate erfolgte nach einem standardisierten Schema. Zunächst wurde das abgewogene S75-Lipid mit Phosphat-Glycerol-Puffer unter Verwendung eines Magnetrührers homogenisiert. Im Anschluss wurden das Fluorochrom sowie das Perfluorkarbon (*perfluoro-15-crown-5-ether*) hinzugegeben. Um eine Gesamtmenge von 10 g pro Emulsion zu erreichen, wurde das Präemulgat mit Phosphat-Glycerol-Puffer aufgefüllt. Das entstandene Präemulgat wurde daraufhin mittels Ultraturrax für 5 Minuten voremulgiert und im Anschluss im Hochdruckhomogenisator weiter homogenisiert.

3.1.1 Herstellung der Nanoemulsionen mittels Hochdruckhomogenisation

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten PFCs:

	PFC	MAL-PFC
PERFLUORKARBON	20 % = 2 g	20 % = 2 g
LIPOID S75	3176,4 µg	3163,0 µg
DSPE-PEG-MALEIMID	-	0,5 mol% = 5,14 mg
FLUORESZENZFARBSTOFF	200 µl [FITC]	200 µl [Atto647]
PHOSPHAT-GLYCEROL-PUFFER	auf 10 g	auf 10 g

Die Präemulsion weist zunächst eine heterogene Partikelgröße im höheren µm-Bereich auf. Die Nanoemulsion sollte idealerweise eine Partikelgröße von 100-150 nm haben, weshalb zur homogenen Zerkleinerung der Partikel die Hochdruckhomogenisation eingesetzt wurde. Der verwendete Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer, LV1) besteht aus einer Hochdruckkolbenpumpe, die einen Druck von 1000 bar erzeugen kann, sowie einer Hochdruckdispergiereinheit. Die Hochdruckhomogenisierung basiert auf mehreren

Mechanismen, insbesondere auf Kavitation sowie Strömungs- und Scherkräften. Die Kavitation beruht auf dem Bernoulli Prinzip, wonach in einem durchströmenden System die Summe aus dynamischem und statischem Druck konstant bleibt.

Nachdem das Präemulgat über das Ventil eingesogen wurde, wird die Probe durch die Hochdruckpumpe mit konstantem Druck von 1000 bar in die Interaktionskammer gepumpt. Dabei erreicht der Produktstrom Geschwindigkeiten von bis zu 300 m/s und wird entlang der Kanalwand starken Scherkräften ausgesetzt. Während der Passage durch den Interaktionskanal durchläuft die Probe mehrere Mikrokanäle. Durch diese Verengungen kommt es zu einer Steigerung des dynamischen Drucks bei gleichzeitiger Abnahme des hydrostatischen Drucks (Bernoulli). Sinkt der hydrostatische Druck unter den Dampfdruck des Dispergators, kommt es zur Bildung von Gasbläschen. Nach Passage der Probe durch die Mikrokanäle nimmt der Durchmesser wieder zu, wodurch der hydrostatische Druck zunimmt, und der dynamische Druck abnimmt. Es kommt zur Implosion der Gasbläschen und folglich zur Zerkleinerung der großen Partikel. Nach insgesamt fünf Zyklen durch den Microfluidizer werden homogene Partikelgrößen von etwa 100 nm erreicht. Im Anschluss wird die Nanoemulsion bei 4 °C gelagert.

3.1.2 Charakterisierung der Nanoemulsionen

Die hergestellten Nanoemulsionen werden mittels DLS Analysegerät Nanotrac Wave II (Microtrac) charakterisiert. Untersucht wurden dabei die Partikelgröße, der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zeta-Potential (ζ -Potential). Die Messungen basieren auf der dynamischen Lichtstreuung mit Laser-verstärktem Signal in Rückstreuung. Das DLS-Analysegerät besteht aus einem Laser, einer Sonde mit optischem Faserkoppler, einem Y-Beam-Splitter, einer Probenkammer, einem Saphirglas sowie einem Detektor. Der Laser wird auf das Probenvolumen nahe der Grenzfläche zwischen der Sonde und der Dispersion fokussiert, wobei ein Teil des Laserstrahls am Saphirglas zurück an den Photodiodendetektor reflektiert wird. Der andere Teil durchdringt die Dispersion und wird an den Partikeln gestreut, wobei das Streulicht in einem Winkel von 180 ° zum Detektor gelangt. Der reflektierte Laserstrahl mischt sich mit dem Streulicht der Partikel und addiert die große Amplitude des Laserstrahls zu der kleinen Amplitude des Streusignals. Das resultierende Signal kann durch eine Fourier-Transformation in ein lineares Frequenz-Powerspektrum umgewandelt werden. Durch anschließende logarithmische Auswertung lässt sich die

Partikelgrößenverteilung bestimmen (Microtrac MRB). Die Proben wurden 2:100 verdünnt und jeweils 10 Messzyklen durchgeführt.

Die Fluoreszenzstärke der Nanoemulsionen wurde mit dem iBright FL1000 bestimmt. Hierfür wurden die Proben nebeneinander auf eine Platte aufgetragen und mittels geeigneten Filtereinsätzen die verwendete Fluoreszenz eingestellt und die Stärken miteinander verglichen.

3.2 Modifikation von Nanoemulsionen

Die Nanoemulsionen können nach ihrer Herstellung durch eine gezielte Oberflächenmodifikation weiter funktionalisiert werden. Hierbei können Liganden oder Peptide an reaktive Gruppen der PFCs gekoppelt werden. Durch die Modifikation der Nanoemulsionen kann die Zielgerichtetheit der Emulsion beeinflusst und die Aufnahme in spezifische Immunzellen optimiert werden. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen beschrieben.

Tabelle 8: Zusammensetzung der modifizierten PFCs

	PFCs	hN-Peptid	CD47	Chol-PEG	Puffer
PEG-PFCs Kontrolle	400 µl	-	-	-	-
PEG-PFCS 5 mol%	400 µl	-	-	1,68 mg	-
PEG-PFCS 10 mol%	400 µl	-	-	3,34 mg	-
PEG-PFCS 20 mol%	400 µl	-	-	6,68 mg	-
hN PEG-PFCs Kontrolle	400 µl	22,88 µg	-	-	-
hN PEG-PFCs 5 mol%PEG	400 µl	22,88 µg	-	1,68 mg	-
hN PEG-PFCs 10 mol%PEG	400 µl	22,88 µg	-	3,34 mg	-
hN PEG-PFCs 20 mol%PEG	400 µl	22,88 µg	-	6,68 mg	-
CD47-PFCs Kontrolle	400 µl	-	-	-	217,14 µl
CD47-PFCs 0,1 mol%	400 µl	-	43,43 µg	-	173,7 µl
CD47-PFCs 0,25 mol%	400 µl	-	108,57 µg	-	108,57 µl
CD47-PFCs 0,5 mol%	400 µl	-	217,14 µg	-	-

CD47 hNPFCs Kontrolle	400 µl	22,88 µg		-	217,14 µl
CD47 hNPFCs 0,1 mol%	400 µl	22,88 µg	43,43 µg	-	173,7 µl
CD47 hNPFCs 0,25 mol%	400 µl	22,88 µg	108,57 µg	-	108,57 µl
CD47 hNPFCs 0,5 mol%	400 µl	22,88 µg	217,14 µg	-	-

3.2.1 PEGylierung von PFCs mittels SPIT

Polyethylenglykol (PEG) wird zur Oberflächenmodifikation in die Lipidhülle der PFC-Nanoemulsionen eingebaut. Grundsätzlich gibt es zwei Methoden zur PEGylierung von PFCs. Zum einen über Cholesterol-PEG₂₀₀₀ welches nach Herstellung der PFCs eingebaut wird und zum anderen mittels DSPE-PEG₂₀₀₀ welches bereits während der PFC-Herstellung integriert wird. In dieser Arbeit wurde Cholesterol-PEG₂₀₀₀ verwendet und nachträglich mittels Sterol-basierter post-Insertionstechnik (SPIT) in die PFCs eingebaut. Dabei wird Cholesterol spontan in die Lipidhülle der bereits hergestellten PFC-Nanoemulsion eingebaut. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene PEGylierungen hergestellt: 5 mol%, 10 mol% und 20 mol%, dafür wurde die entsprechende Menge Cholesterol-PEG₂₀₀₀ den Emulsionen hinzugefügt und über Nacht bei 20 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert.

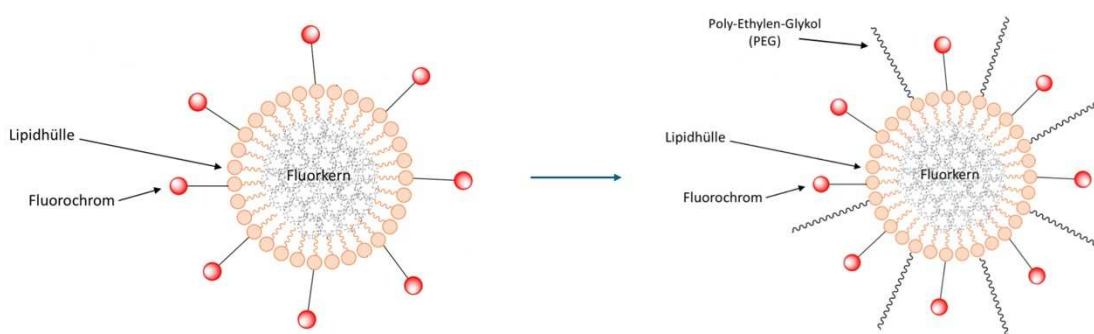


Abb. 4: Schematische Darstellung der PEGylierung von PFCs

Links ist die PFC-Nanoemulsion mit Fluorkern, Lipidhülle und Fluorochrom dargestellt, rechts wird die Kopplung mittels Cholesterol-PEG₂₀₀₀ visualisiert durch Hinzufügen der PEG-Ketten an die Nanoemulsion.

3.2.2 Kopplung von NG2 an MAL-PFCs

Für die Kopplung des Neutrophilenpeptids (hN) an die PFC-Nanoemulsionen wurden Maleimid funktionalisierte Emulsionen (^{Mal}PFCs) hergestellt. Hierfür wurde bereits während der Herstellung der PFCs DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimid dem Prä-Emulgat beigefügt. Die Kopplung des Peptids erfolgt über eine Thiol-Maleimid-Reaktion zwischen der terminalen Cystein-Gruppe des Peptids und der Maleimid Gruppe der ^{Mal}PFCs. Das Peptid wurde im fünffachen Unterschuss bezogen auf die vorhandenen Maleimid-Gruppen der Emulsion zugefügt und über Nacht bei 20 °C unter konstantem Schütteln inkubiert. Es wurden 22,88 µg des hN-Peptids zu 400 µl der Emulsion hinzugefügt.

3.2.3 hN-PFCs in Kombination mit einer PEGylierung

Nach Herstellung der hN-PFCs wurde die Oberfläche der Emulsion zusätzlich PEGyliert. Die PEGylierung erfolgte, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, nachträglich mittels Sterol-basierter post-insertions-Technik (SPIT). Es wurden drei verschiedene PEGylierungen hergestellt: 5 mol%, 10 mol% und 20 mol%. Es wurde die entsprechende Menge Cholesterol-PEG₂₀₀₀ zu den hN-PFCs gegeben und über Nacht bei 20 °C unter konstantem Schütteln inkubiert.

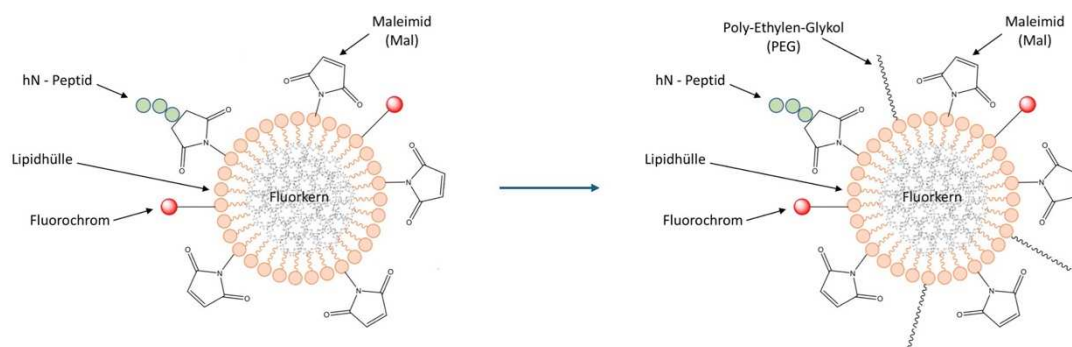


Abb. 5: Schematische Darstellung der PEGylierung von ^{hN}PFCs

Links sind nicht-PEGylierte ^{hN}PFCs dargestellt und rechts nach einer PEGylierung mit Cholesterol-PEG₂₀₀₀.

3.2.4 Herstellung einer CD47 Emulsion

Für die Kopplung des CD47-Peptids an die Emulsion wurden Maleimid-funktionalisierte Nanoemulsionen (^{Mal}PFCs) verwendet. Die Bindung des Peptids erfolgt über eine Thiol-Maleimid-Reaktion durch Bindung mit seiner terminalen

Cystein-Gruppe an die Maleimid-Gruppe der ^{Mal}PFCs. Es wurden drei verschiedene Verhältnisse des CD47-Peptids zu den vorhandenen Maleimid-Gruppen getestet (1:1, 1:2 und 1:5). Hierfür wurden 217,14 µg, 108,57 µg und 43,43 µg des CD47-Peptids jeweils zu 400 µl der Emulsion beigefügt und über Nacht bei 20 °C unter konstantem Schütteln inkubiert.

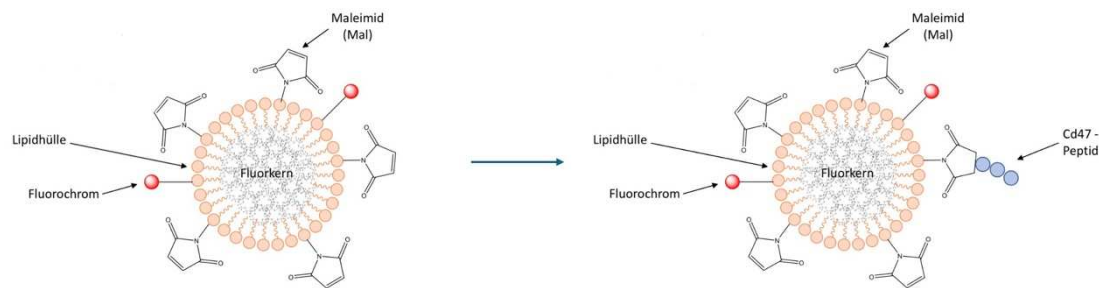


Abb. 6: Schematische Darstellung von CD47-funktionalisierten ^{Mal}PFCs

In der Abbildung erkennt man links ^{Mal}PFCs und rechts CD47-funktionalisierte ^{Mal}PFCs nach der Kopplung.

3.2.5 hN-PFCs in Kombination mit dem CD47-Peptid

Zur Kombination von aktivem Targeting und CD47 wurden sowohl das neutrophilenspezifische hN-Peptid als auch das CD47-Peptid an ^{Mal}PFCs gekoppelt. Die Kopplung wurde zweizeitig durchgeführt. Zunächst wurde das CD47 Peptid in den Verhältnissen 1:1, 1:2 und 1:5 zu jeweils 400 µl der ^{Mal}PFCs hinzugefügt und für eine Stunde bei 20 °C unter konstantem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde das hN-Peptid im fünffachen Überschuss bezogen auf die Maleimid-Gruppen zugegeben und über Nacht bei 20 °C unter konstantem Schütteln inkubiert.

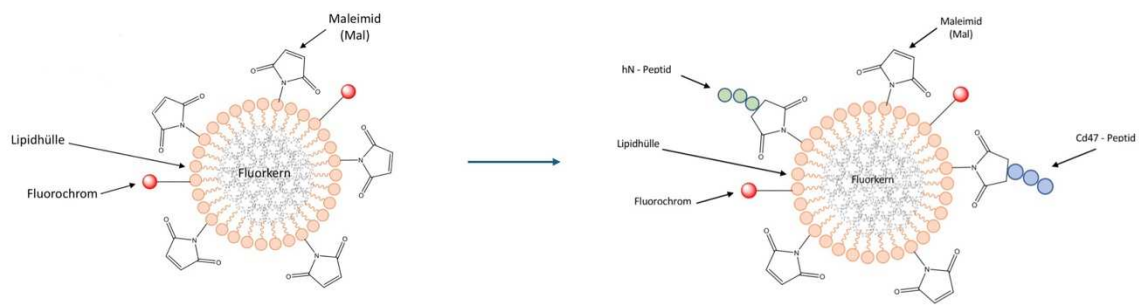


Abb. 7: Schematische Darstellung von $^{CD47/hN}$ PFCs

Links sind Mal PFCs dargestellt und rechts nach einer zweizeitigen Kopplung mit CD47 und hN-Peptid.

3.3 Humane Immunzellen aus Vollblut

3.3.1 Ethikvotum

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erteilte am 08.10.2018 ein positives Ethikvotum für die Studiennummer: 6194R. Als Probanden wurden einwilligungsfähige Erwachsene im Alter von 18-49 Jahren eingeschlossen.

3.3.2 Isolierung Immunzellen aus humanem Vollblut

Für die Versuche wurde frisch entnommenes humanes Vollblut verwendet. Zur Isolierung der Immunzellen: neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit Erythrozytenlysepuffer in ein 50 ml Falcon überführt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 350 xg für 10 Minuten zentrifugiert und der flüssige Überstand mittels Vakuumsauger entfernt. Das zunächst vorhandene rötliche Zellpellet wurde erneut in 10 ml Erythrozytenpuffer resuspendiert und in ein neues 10 ml Falcon überführt. Dieser Waschschrift wurde so lange wiederholt, bis das Zellpellet weiß und somit frei von Erythrozyten war. Abschließend wurde das Zellpellet in DMEM aufgenommen.

3.4 Zelluläre Aufnahme der PFCs

3.4.1 Allgemeiner Versuchsablauf mit Zeitkinetik

Die isolierten humanen Immunzellen wurden auf 2 ml Eppendorf-Gefäße (Eppi) verteilt. Hierzu wurden jeweils 1 ml der Immunzell-DMEM-Suspension in ein Eppi

pipettiert. Zu jedem Ansatz wurden anschließend 10 µl der jeweiligen Nanoemulsion (PFCs, ^{MAL}PFCs, ^{PEG}PFCs, ^{CD47}PFCs, ^{hN}PFCs und ^{CD47|hN}PFCs) hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben in einem Inkubator auf eine Schwenkplatte bei 37°C konstant inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0, 10, 20, 40 und 60 Minuten) wurden jeweils 100 µl der Proben entnommen, in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 500 xg für 5 Minuten. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellpellets in 200 µl MACS-DAPI-Puffer resuspendiert und erneut auf Eis gelagert. DAPI wurde als fluoreszierender Farbstoff zur Lebend- und Tot-Differenzierung der Zellen verwendet. Im Anschluss wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt und am BD FACSCanto II analysiert.



Abb. 8: Schematische Darstellung des Workflows

Zunächst werden die PFCs und ^{MAL}PFCs am Hochdruckhomogenisator hergestellt. Es folgt die Modifikation der Nanoemulsionen durch Kopplung von PEG, hN-Peptid und CD47, sodass folgende Emulsionen entstehen: PFCs, ^{MAL}PFCs, ^{PEG}PFCs, ^{CD47}PFCs, ^{hN}PFCs und ^{CD47|hN}PFCs. Die Nanoemulsionen werden daraufhin charakterisiert. Nach Isolierung der Immunzellen aus humanem Vollblut werden die jeweiligen PFCs den Immunzellen beigefügt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Abschließend erfolgt die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Hergestellt mit Biorender.com

3.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Analyse der zellulären Aufnahme der verschiedenen PFC-Nanoemulsionen in den Immunzellen verwendet. Sie basiert auf der Detektion von ausgesendetem Streu- und Fluoreszenzlicht einzelner Zellen. Die Immunzellen werden hierfür vorab mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen versehen. In dieser Arbeit waren die PFC-Emulsionen mit FITC und ATTO647-DPPE markiert, Monozyten wurden über einen CD14-Antikörper identifiziert und alle Zellen mittels

DAPI zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen gefärbt. Die Proben in den FACS-Röhrchen werden in die Kammer des Durchflusszytometers platziert wo die einzelnen Zellen als Flüssigkeitsstrom durch den Laser angeregt werden. Durch Anregung der Fluorochrome fluoreszieren die mit Antikörpern markierten Zellen in bestimmten Wellenlängenbereichen. Die emittierte Fluoreszenz ermöglicht die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen. Zusätzlich werden zwei Streulichparameter erfasst. Zum einen das Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Scatter*) das mit der Zellgröße und Zellform korreliert und zum anderen das Seitwärtsstreulicht (SSC, *Side Scatter*) das Informationen über die Granularität und innere Struktur der Zellen liefert. Ein besonderer Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass mehrere tausend Zellen pro Sekunde gleichzeitig auf mehrere Parameter analysiert werden können. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo (BD, Heidelberg, Deutschland) und wurde in Form von Histogrammen und Punktdiagrammen visualisiert.

3.5 CD47 Expression

In diesem Versuch wurde die Expression von CD47 auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten untersucht. Der Versuch wurde *ex vivo* an humanen Immunzellen durchgeführt. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurden die Immunzellen isoliert und in einer 96-Well Platte weiterverarbeitet.

Hierfür wurden jeweils 10 µl der Zell-DMEM-Suspension in 90 µl MACS-Puffer aufgenommen und im Anschluss für 5 Minuten bei 400 xg zentrifugiert. Parallel wurde ein Antikörpermisch aus 1 µl CD47-AK, 1 µl CD14-AK und 100 µl MACS-Puffer hergestellt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet mit dem Antikörpermisch suspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben erneut für 5 Minuten bei 400 xg zentrifugiert. Als weiteren Waschschriff wurde das Zellpellet in MACS-Puffer aufgenommen und ebenfalls für weitere 5 Minuten bei 400 xg zentrifugiert. Als letzten Schriff wurde das Zellpellet in 100 µl DAPI-MACS-Puffer aufgenommen, um auch hier eine Lebend-/Tot-Differenzierung zu erkennen. Die abschließende Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne CD47-Antikörper verwendet, der lediglich CD14-AK, DAPI und MACS-Puffer enthielt.

3.6 SIRP α (CD47-Rezeptor) Expression

Im nächsten Versuch wurde analog zur CD47-Expression die Expression des CD47-Rezeptors SIRP α auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten untersucht. Er dient der Qualitätskontrolle zur Überprüfung, ob alle drei Immunzellpopulationen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) den Rezeptor exprimieren. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Protokoll. Nach der Isolierung der humanen Immunzellen wurden die Zellen ebenfalls mit einem Antikörpergemisch inkubiert. Anstelle des CD47-Antikörpers wurde hier der CD172a/b-Antikörper verwendet, welcher spezifisch an den SIRP α -Rezeptor bindet. Der Antikörper wurde auch hier in einem Verhältnis von 1:100, also 1 μ l CD172a/b-AK auf 100 μ l MACS-Puffer, eingesetzt. Die Analyse erfolgt abschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS) wie zuvor beschrieben.

4. ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Dissertation ist die Optimierung des Abschirmungseffekts von PFC-Nanoemulsionen zur Reduktion der unspezifischen Aufnahme durch phagozytotische Zellen und zur Erhöhung der Spezifität gegenüber neutrophilen Granulozyten. Hierzu wurden Oberflächenmodifikation mittels PEGylierung und CD47-Funktionalisierung durchgeführt, um die unspezifische phagozytische Aufnahme zu reduzieren. Beide Ansätze wurden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um ein optimales Verhältnis hinsichtlich der Abschirmung zu untersuchen.

Ergänzend wurde ein neutrophilenspezifisches Peptid (hN) an die Emulsion gekoppelt, um ein aktives Targeting der neutrophilen Granulozyten zu ermöglichen und somit deren selektive Aufnahme zu steigern. Anschließend wurde analysiert, inwieweit die Kombination dieser Strategien eine Balance zwischen reduzierter unspezifischer Phagozytose und erhöhter zielgerichteter Aufnahme ermöglicht.

4.1 Herstellung und Charakterisierung von PFCs und ^{MAL}PFCs

Zunächst wurden die für die Arbeit benötigten PFC-Nanoemulsionen sowie Maleimid-funktionalisierte Nanoemulsionen (^{MAL}PFCs) hergestellt. Die Charakterisierung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), wobei die Größe der Partikel, der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zeta-Potential bestimmt wurden. Zusätzlich wurde die Fluoreszenzintensität der Emulsionen analysiert. In Abbildung 9 ist der Vergleich von PFCs und ^{MAL}PFCs dargestellt. Dabei zeigt sich, dass ^{MAL}PFCs sowohl eine größere Partikelgröße als auch ein negativeres Zeta-Potential aufweisen. Während die PFCs einen mittleren Durchmesser von 125 nm aufweisen, haben die ^{MAL}PFCs im Durchschnitt 140 nm. Der Polydispersitätsindex liegt bei beiden Emulsionen bei etwa 0,14. Das Zeta-Potential beträgt für die PFCs im Mittel -20 mV, während das Zeta-Potential der ^{MAL}PFCs mit etwa -28 mV negativer ist.

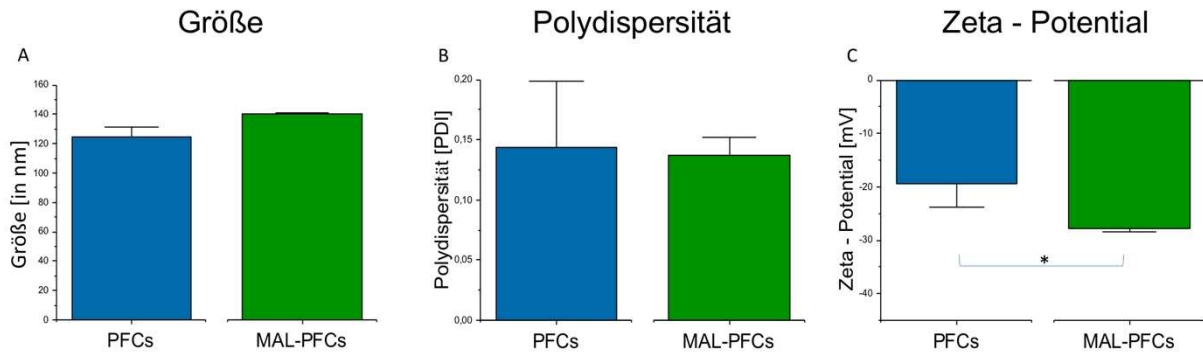


Abb. 9: Charakterisierung der PFCs

Abgebildet ist der Vergleich zwischen PFCs (blau) und MAL-PFCs (grün). Links ist die Partikelgröße der Emulsionen (in nm), in der Mitte der PDI und rechts das Zeta-Potential (in mV) dargestellt, deren Parameter mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt wurden. Die Partikel der MAL-PFCs sind größer als die einfachen PFCs und auch das Zeta Potential ist negativer. Abgebildet sind Mittelwerte und SD von n=3 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$ [Signifikanztest mittels One-Way ANOVA].

4.2 Einfluss des Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE auf die passive Aufnahme durch humane Immunzellen

Im Anschluss an die Charakterisierung der PFCs und MAL-PFCs wurde untersucht, ob die in den MAL-PFCs enthaltene Grund-PEGylierung von 0,05 mol% (DSPE-PEG-Maleimid) bereits einen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme hat. Hierfür wurden PFCs und MAL-PFCs den Immunzellen *ex vivo* beigefügt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Dabei zeigte sich, dass das mittlere Fluoreszenzsignal sowohl in neutrophilen Granulozyten als auch insbesondere in Monozyten bei den MAL-PFCs im Vergleich zu den PFCs erhöht war (Abb. 10). Im zeitlichen Verlauf nahm das Signal in den Monozyten nach 20 Minuten sowohl bei den PFCs als auch bei den MAL-PFCs wieder ab. In Lymphozyten zeigten sich vergleichbare Fluoreszenzsignale zwischen PFCs und MAL-PFCs.

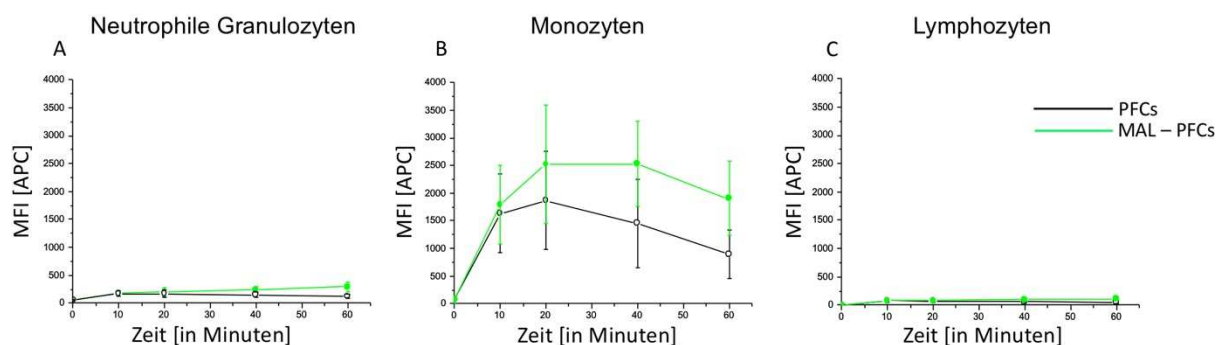


Abb. 10: Vergleich der zellulären Aufnahme von PFCs und MAL-PFCs

Abgebildet ist die passive zelluläre Aufnahme der PFCs (schwarz) im Vergleich zu ^{MAL}PFCs (grün). Die Aufnahme in den Neutrophilen Granulozyten (**A**) und vor allem in den Monozyten (**B**) sind in den ^{MAL}PFCs (grün) höher als bei den normalen PFCs. Bei den Lymphozyten (**C**) ist kaum ein Unterschied ersichtlich und die PFC-Aufnahme allgemein geringer. Abgebildet sind Mittelwerte mit SD und n = 4 unabhängigen Experimenten

4.3 PEGylierung von PFCs

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der PEGylierung von PFC-Nanoemulsionen auf die zelluläre Aufnahme in humane Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bei der PEGylierung wird Polyethylenglykol (PEG) in die Lipidhülle der PFC-Nanoemulsion eingebaut, wodurch eine Abschirmung gegenüber Serumproteinen erreicht werden soll. Dies führt zu einer reduzierten unspezifischen Aufnahme der PFCs durch phagozytische Immunzellen.

4.3.1 Charakterisierung PEGylierter PFCs

Zur Untersuchung des Einflusses der PEGylierung wurden zunächst die physikochemischen Eigenschaften der modifizierten Nanoemulsionen analysiert. Die PEGylierung der PFCs wurde mittels Sterol-basierter Post-Insertions-Technik (SPIT) durchgeführt. Hierbei wurde Cholesterol-PEG₂₀₀₀ nachträglich in die Lipidhülle der bereits angefertigten Emulsionen eingebaut [80]. Es wurden drei verschiedene PFC-PEGylierungen hergestellt: 5 mol%, 10 mol% und 20 mol%. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der PEGylierten PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung. Hierbei wurde die Partikelgröße, der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zeta-Potential mit den unpegylierten PFCs verglichen. Der Vergleich ist in Abbildung 11 dargestellt. Hier zeigt sich, dass die PEGylierten PFCs mit einer mittleren Größe von ungefähr 150 nm größer als die unpegylierten PFCs sind, welche eine mittlere Größe von etwa 125 nm aufweisen. Der PDI ist bei allen Emulsionen bei etwa bei 0,14. Das Zeta-Potential ist bei den PEGylierten PFCs negativer als bei den unpegylierten PFCs, die im Mittel ein Zeta-Potential von -20 mV aufweisen. Mit zunehmender PEGylierung zeigt sich sowohl eine Abnahme des PDI als auch des Zeta-Potentials.

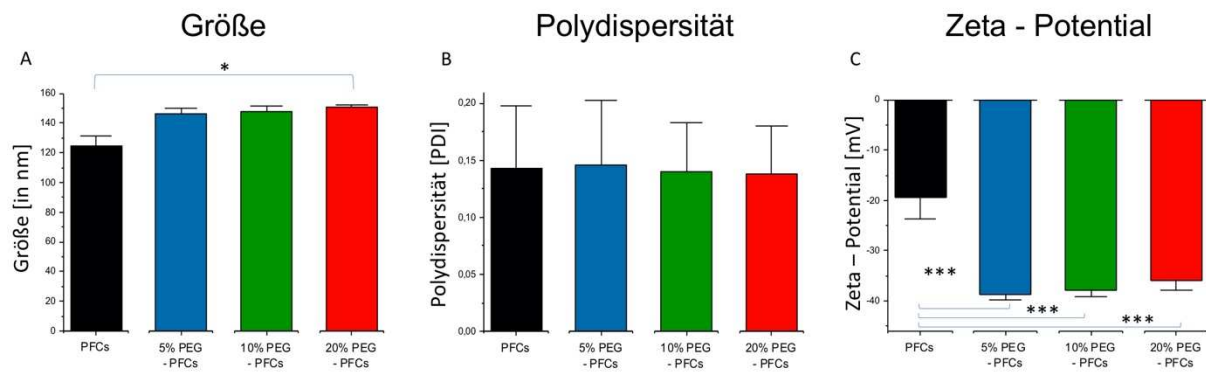


Abb. 11: Charakterisierung von PFCs und ^{PEG}PFCs

Abgebildet ist der Vergleich zwischen PFCs und PEGylierten-PFCs [5-, 10- und 20 mol%]. Links ist die Partikelgröße der Emulsionen (in nm), in der Mitte der PDI und rechts das Zeta Potential (in mV) dargestellt. Die Partikel der PEGylierten PFCs sind größer als die unpegylierten PFCs und auch das Zeta Potential ist negativer. Der PDI ist ähnlich. Abgebildet sind Mittelwerte und SD von $n = 3$ unabhängigen Versuchen. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$ [Signifikanztest mittels One-Way ANOVA].

4.3.2 Vergleich der passiven zellulären Aufnahme von PFCs und ^{PEG}PFCs

Nach Herstellung und Charakterisierung der unterschiedlich PEGylierten PFCs wurde deren zelluläre Aufnahme in neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten *ex vivo* untersucht. Hierfür wurden Immunzellen aus humanem Vollblut isoliert und im Anschluss mit den unterschiedlichen Emulsionen inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 40 und 60 Minuten wurden jeweils Proben entnommen und die Aufnahme durch Immunzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Es zeigt sich, dass unPEGylierte PFCs über die Zeit insbesondere von Monozyten aufgenommen wurden, während die Aufnahme von neutrophilen Granulozyten geringer ausfiel. In Lymphozyten war nahezu kein Signal nachweisbar. Im Vergleich dazu zeigt sich bei den PEGylierten PFCs eine reduzierte Aufnahme in allen Immunzellpopulationen, wobei insbesondere die Monozyten das schwächste Signal aufwiesen. Mit zunehmender PEGylierung nahm die Signalstärke weiter ab. Ab einer PEGylierung von 10 mol% zeigte sich jedoch kein relevanter Unterschied zu der 20 mol%-PEGylierung. Das wird in Abbildung 12B deutlich, in der der rote Graph (20 mol%-PEG) ein nahezu identisches Signal im Vergleich zum grünen Graphen (10 mol%-PEG) aufweist.

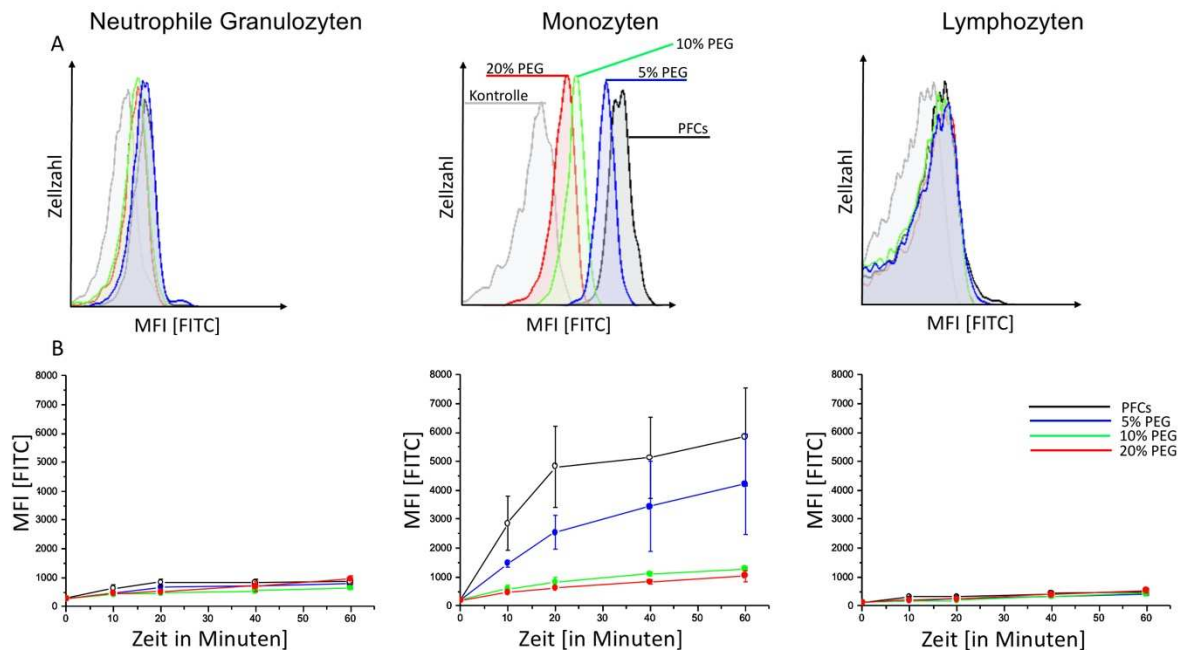


Abb. 12: Zelluläre Aufnahme von PFCs und PEG-PFCs ex vivo

A: Die Histogramme stellen die zelluläre Aufnahme der Immunzellen zum Zeitpunkt von 20 Minuten im Vergleich zu der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 (grau) dar. Abgebildet sind Mittelwerte mit SD von $n=5$ unabhängigen Experimenten. **B:** Abgebildet ist die Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme der PFC-Emulsion (schwarz) im Vergleich zu 3 verschiedenen PEGylierungen (blau: 5 mol% PEG, grün: 10 mol% PEG und rot: 20 mol% PEG) ex vivo. PFCs mit einem höheren PEG-Anteil weisen eine reduzierte zelluläre Aufnahme auf, insbesondere bei Monozyten und neutrophilen Granulozyten.

4.4 Aktives Targeting von humanen neutrophilen Granulozyten mittels Targeting-PFCs

Nachdem der Einfluss des PEG auf die Aufnahme von PFCs durch Immunzellen gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Kombination aus PEGylierung und aktivem Targeting von Neutrophilen untersucht. Hierfür wurde ein neutrophilenspezifisches Peptid (hN) verwendet, welches mittels Phagendisplay identifiziert wurde und spezifisch an CD177 auf neutrophilen Granulozyten bindet [81]. Zur Kopplung des Peptids an die PFCs wurde das Peptid C-terminal mit einem Cystein ausgestattet, wodurch eine Bindung mittels *click-chemistry* an Maleimid-Gruppen erfolgen kann [82].

Für die nachfolgenden Versuche wurden daher Maleimid Emulsionen (^{MAL}PFCs) verwendet. Das DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimid wurde bereits während der Herstellung der Nanoemulsionen dem Prä-Emulgat hinzugefügt und weist daher eine Grund-PEGylierung von 0,05 mol% auf. Im Anschluss wurden die ^{MAL}PFCs mit dem neutrophilenspezifischen Peptid (hN) funktionalisiert, um eine gezielte Aufnahme durch neutrophile Granulozyten zu ermöglichen. Zusätzlich wurden nachträglich

verschiedene PEGylierungen mittels SPIT an den Targetingemulsionen durchgeführt, um die unspezifische Aufnahme durch andere Immunzellen zu reduzieren.

4.4.1 Charakterisierung der hN-Targetingemulsionen

Nach Herstellung der ^{hN}PFCs wurden sie mittels DLS-Messung charakterisiert. Es wurden die Partikelgröße, der Polydispersitätsindex (PDI) sowie das Zeta-Potential untersucht. In Abbildung 13 ist der Vergleich zwischen ^{MAL}PFCs und ^{hN}PFCs dargestellt. Dabei zeigt sich, dass ^{MAL}PFCs mit einem Mittelwert von ungefähr 140 nm geringfügig kleiner sind als ^{hN}PFCs, die je nach PEGylierung maximal einen Mittelwert von bis zu 145 nm aufweisen. Insbesondere die 10 mol% und 20 mol% PEGylierten ^{hN}PFCs zeigen eine größere Partikelgröße als die grund-PEGylierten ^{MAL}PFCs. Die 5 mol% PEGylierten ^{hN}PFCs weisen mit einem Mittelwert von 0,12 den kleinsten PDI auf. Die 0,05 mol% grund-PEGylierten ^{MAL}PFCs und 10 mol% PEGylierten ^{hN}PFCs zeigen vergleichbare PDI-Werte mit einem Mittelwert von 0,14. Die 20 mol% PEGylierten ^{hN}PFCs weisen hingegen mit einem Mittelwert von etwa 0,17 den höchsten PDI auf. Das Zeta-Potential ist bei allen drei ^{hN}PFCs negativer als bei den ^{MAL}-PFCs und liegt bei etwa -28 mV.

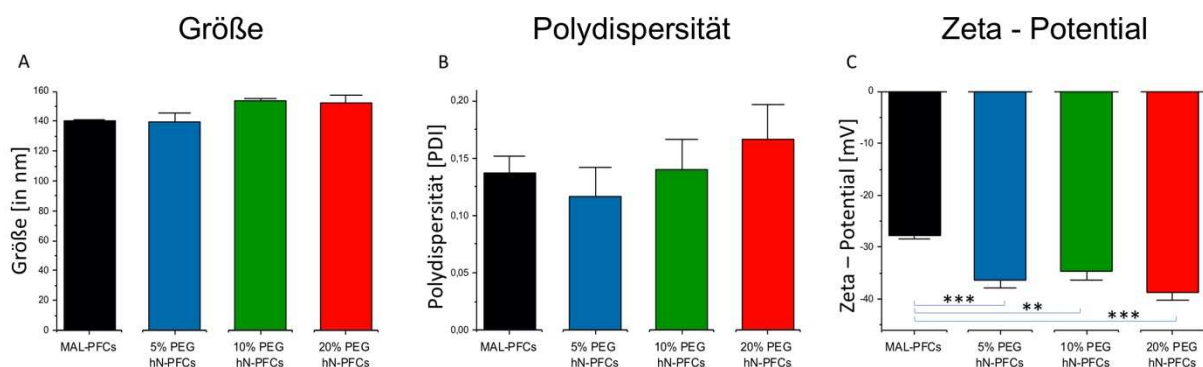


Abb. 13: Charakterisierung von ^{MAL}PFCs und ^{hN}PFCs

Dargestellt sind von links nach rechts (**A**) die mittlere Partikelgröße in (nm), (**B**) der Polydispersitätsindex (PDI) und (**C**) das Zeta-Potential für ^{MAL}PFCs und verschiedene PEGylierungen der ^{hN}PFCs (5-, 10- und 20 mol% PEG). Die Partikel der PEGylierten ^{hN}PFCs sind größer als die ^{MAL}PFCs und auch das Zeta Potential ist negativer. Abgebildet sind Mittelwerte und SD von n = 3 unabhängigen Experimenten. ** = p < 0,005, *** = p < 0,001 [Signifikanztest mittels One-Way ANOVA].

4.4.2 Zelluläre Aufnahme der Targetingemulsionen

Nach der Kopplung des hN-Peptids und anschließender PEGylierung der Targetingemulsion wurde die zelluläre Aufnahme in humane Immunzellen untersucht. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zeigte ein deutliches

Fluoreszenzsignal in den neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit h^N PFCs, während in Monozyten und Lymphozyten nur eine geringe Signalintensität nachweisbar war. Die stärksten Fluoreszenzsignale wurden nach 40 Minuten gemessen. Insbesondere in den neutrophilen Granulozyten zeigte sich nach 40 Minuten eine Abnahme der Signalintensität. Mit zunehmender PEG-Konzentration nahm sowohl in neutrophilen Granulozyten, Monozyten, als auch Lymphozyten die Signalintensität ab. Die stärksten Effekte wurden bei einer PEGylierung von 5 mol% und 10 mol% beobachtet. Dabei zeigt sich, dass die PEGylierung nicht nur die Aufnahme in Monozyten reduzierte, sondern auch die Signalintensität in den neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu nicht-PEGylierten h^N PFCs abnahm (Abb. 14).

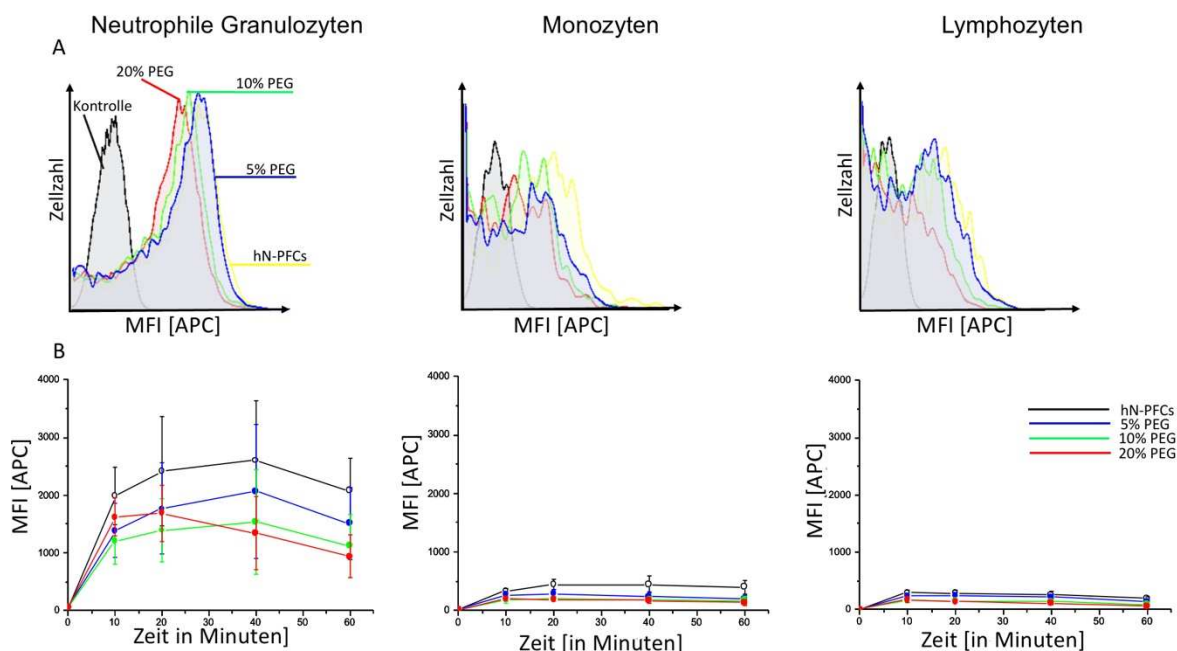


Abb. 14: Zeitkinetik der zellulären Aufnahme von h^N PFCs ex vivo

A: Die Histogramme stellen die zelluläre Aufnahme der Immunzellen zum Zeitpunkt von 60 Minuten im Vergleich zu der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 (schwarz) dar. Abgebildet sind Mittelwerte mit SD von $n=5$ unabhängigen Experimenten. **B:** Abgebildet ist die zelluläre Aufnahme (Fluoreszenzsignal APC) der h^N PFCs durch neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in einer Zeitkinetik (0, 10, 20, 40 und 60 Minuten). Im schwarzen Graphen ist das Fluoreszenzsignal der h^N PFCs im blauen Graphen von 5 mol%-pegylierten h^N PFCs, im grünen Graphen von 10 mol%-pegylierten h^N PFCs und im roten Graphen von 20 mol%-pegylierten h^N PFCs dargestellt. Die Kombination der PEGylierung mit dem Neutrophilenpeptid hN zeigt, dass steigende PEGylierungsmengen das Targeting von h^N PFCs reduzieren. Dargestellt sind Mittelwerte und SD von $n=5$ unabhängigen Experimenten.

4.5 CD47 Peptid

Im nächsten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des CD47-Peptids als weitere Strategie zur Modifikation der zellulären Aufnahme von PFC-Nanoemulsionen untersucht.

Nahezu alle körpereigenen Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche CD47, das über sein „don't eat me“-Signal die Phagozytose durch Immunzellen hemmen kann [83, 84]. Die Kopplung des CD47-Peptids an PFC-Nanoemulsionen sollte so die unspezifische phagozytische Aufnahme durch Immunzellen, insbesondere Monozyten, reduzieren.

4.5.1 Vorkommen von CD47 auf der Zelloberfläche von Immunzellen

Zur Untersuchung der CD47 Expression wurde das Vorkommen von CD47 auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten *ex vivo* analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse in Abbildung 15 zeigt, dass CD47 auf allen drei untersuchten Immunzellpopulationen nachweisbar ist. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten alle drei Immunzellpopulationen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit dem CD47-Antikörper. Die höchste mittlere Fluoreszenzintensität wurde in den Lymphozyten mit etwa 1700, gefolgt von neutrophilen Granulozyten mit etwa 1500 und Monozyten mit etwa 1400.

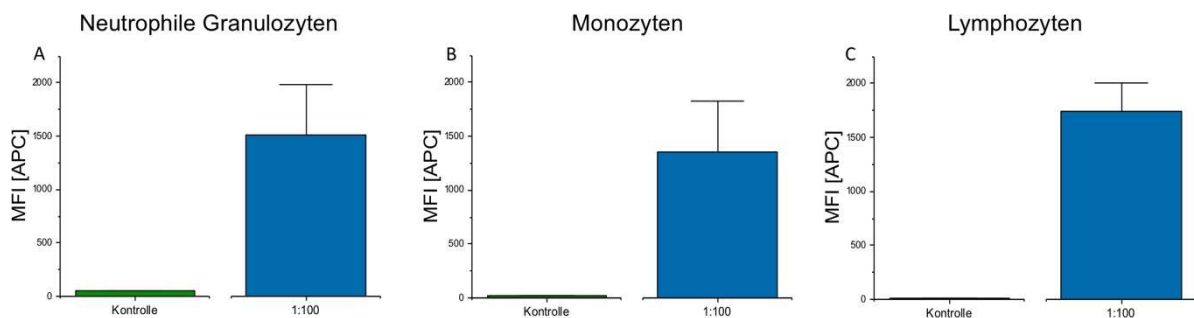


Abb. 15: CD47 Expression auf der Zelloberfläche

A-C: Abgebildet ist die Bindung der Immunzellpopulationen mit dem AK gegen CD47 (mittleres Fluoreszenzsignal [APC]). **(A)** Neutrophile Granulozyten, **(B)** Monozyten und **(C)** Lymphozyten. Das Fluoreszenzsignal spiegelt das Vorkommen des CD47 Proteins auf den Zellenpopulationen wider. Der linke Graph stellt die Kontrolle dar (ohne AK) und rechts die Bindung des CD47-AK an die Immunzellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit SD von n=5 unabhängigen Experimenten.

4.5.2 CD47 Rezeptor Expression auf der Zelloberfläche von Immunzellen

Neben der Expression von CD47 auf der Zelloberfläche wurde auch die Expression des CD47-Rezeptors SIRP α auf den Immunzellen untersucht. Hierfür wurde ein Antikörper gegen CD172 α verwendet, der spezifisch an den SIRP α -Rezeptor bindet. Die in Abbildung 16 dargestellte durchflusszytometrische Auswertung zeigt, dass insbesondere Monozyten mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 1500 und neutrophile Granulozyten von etwa 1250 deutliches Fluoreszenzsignal im Vergleich zu

Kontrolle aufweisen. Demgegenüber zeigen Lymphozyten nahezu keine Zunahme der Fluoreszenzintensität, sodass hier kein ausgeprägter Effekt nachweisbar ist.

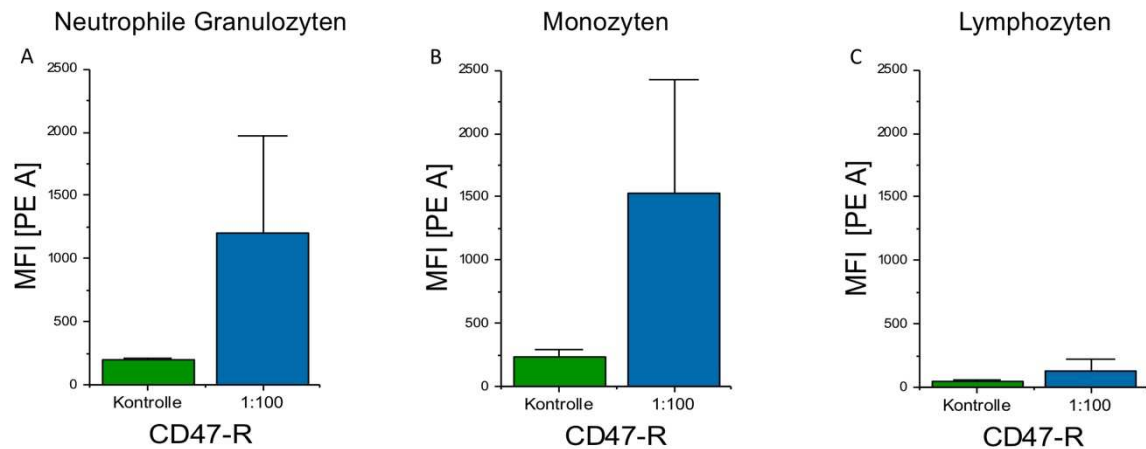


Abb. 16: SIRP α Expression auf der Zelloberfläche

A-C: Abgebildet ist das mittlere Fluoreszenzsignal auf Immunzellen (**A** Neutrophile Granulozyten, **B** Monozyten und **C** Lymphozyten) der Oberflächenexpression von CD47R (CD172 α). Der linke Graph (grün) stellt die Kontrolle ohne Anwesenheit des AK (CD172 α) gegen den CD47 Rezeptor dar und der rechte Graph (blau) das Fluoreszenzsignal bei Anwesenheit und Bindung des AK an die CD47-Rezeptoren der Immunzellpopulationen. Das CD172-Signal ist vor allem auf den Monozyten (**B**) und Neutrophilen (**A**) ausgeprägt und kaum auf den Lymphozyten (**C**). Dargestellt sind Mittelwerte mit SD von n=5 unabhängigen Experimenten.

4.5.3 Oberflächenmodifikation von MAL-PFCs mittels eines CD47-Peptids

Nachdem in 4.5.2 die Expression des SIRP α -Rezeptors insbesondere auf Monozyten und neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden konnte, wurde für die nächsten Versuche eine Oberflächenmodifikation der MAL-PFC-Emulsionen mit dem CD47 Peptid durchgeführt, um die zelluläre Aufnahme vor allem in den Monozyten zu reduzieren. Hierfür wurden MAL-PFCs mit unterschiedlichen CD47 Konzentrationen (1:5, 1:2 und 1:1) untersucht und mit MAL-PFCs ohne CD47 verglichen.

4.5.4 Charakterisierung der CD47-Targetingemulsionen

Die mit CD47-Peptid funktionalisierten MAL-PFCs wurden mittels DLS-Messungen charakterisiert und hinsichtlich ihrer Größe, ihres Polydispersionsindex sowie ihres Zeta-Potential mit den MAL-PFCs verglichen. In Abbildung 17 zeigt sich, dass sowohl MAL-PFCs als auch CD47-gekoppelte MAL-PFCs eine vergleichbare mittlere Partikelgröße von etwa 140 nm aufweisen. Der PDI nimmt mit steigender CD47 Konzentration zu und erreicht einem maximalen Wert von 0,17. Die MAL-PFCs und die 1:2 CD47-Konzentration zeigten vergleichbare PDI-Werte mit einem mittleren Wert von etwa 0,14. Die PFCs mit einer CD47 Konzentration von 1:5 wiesen mit etwa 0,12 den

niedrigsten PDI auf. Das Zeta-Potential war bei den CD47-gekoppelten ^{MAL}PFCs negativer als bei den ^{MAL}PFCs und lag im Mittel bei etwa -28 mV. Mit steigender CD47-Konzentration war eine Verschiebung des Zeta-Potentials in Richtung weniger negativer Werte zu beobachten.

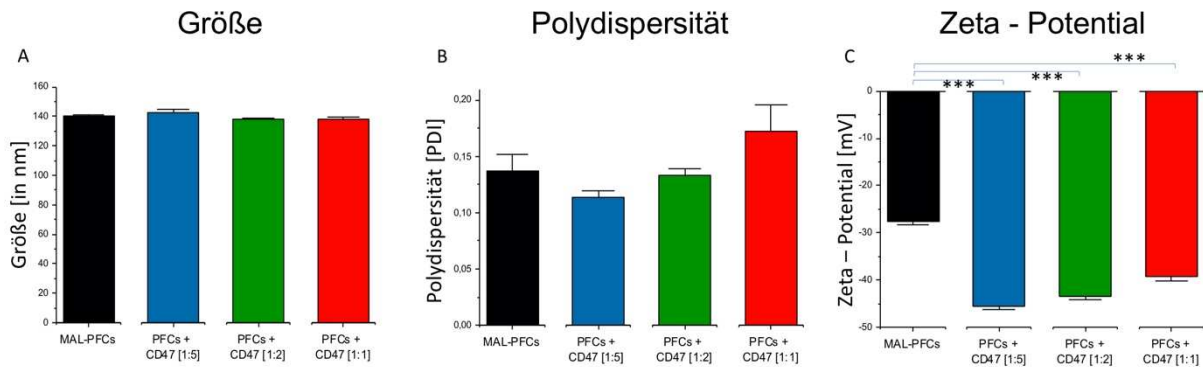


Abb. 17: Charakterisierung von ^{MAL}PFCs und CD47-gekoppelten ^{MAL}PFCs (^{CD47}PFCs)

Abgebildet ist der Vergleich zwischen ^{MAL}PFCs und den verschiedenen Konzentrationen der ^{CD47}PFCs (1:5, 1:2 und 1:1 CD47-Konzentration). Links ist die Partikelgröße der Emulsionen (in nm), in der Mitte der PDI und rechts das Zeta Potential (in mV) dargestellt. Die Partikelgröße ist bei den ^{MAL}PFCs und den ^{CD47}PFCs nahezu gleich groß. Der PDI nimmt mit steigender CD47 Konzentration zu. Das Zeta Potential ist bei den CD47-MAL-PFCs negativer. Abgebildet sind Mittelwerte und SD von n = 3 unabhängigen Experimenten. *** = p < 0,001 [Signifikanztest mittels One-Way ANOVA].

4.5.5 Zelluläre Aufnahme der CD47-Targetingemulsionen

Nach der Charakterisierung der mit CD47-Peptid gekoppelten ^{MAL}PFCs, wurde die passive zelluläre Aufnahme der Targetingemulsionen in humane Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) *ex vivo* untersucht. Im Anschluss erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Die Auswertung zeigt, dass die Kopplung des CD47-Peptids zu einer moderaten Reduktion der phagozytischen Aufnahme in Monozyten führt (Abb. 18). Insbesondere bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:5 zeigte sich die stärkste Signalreduktion in den Monozyten. Nach 40 Minuten ließ sich eine Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität von etwa 700 bei der Kontrolle auf circa 550 feststellen. Zur Hervorhebung der zuvor beschriebenen Ergebnisse ist in Abb. 19 die zelluläre Aufnahme von ^{CD47}PFCs durch Monozyten als AUC (*area under the curve*) dargestellt. Es zeigt sich, dass die CD47-Konzentration im Verhältnis 1:5 mit der geringsten zellulären Aufnahme einhergeht. Das CD47-Peptid zeigte keinen relevanten Effekt auf neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. In beiden Zellpopulationen war die

Fluoreszenzintensität über alle getesteten CD47-Konzentrationen hinweg vergleichbar mit der Kontroll-emulsion und lag bei etwa 200.

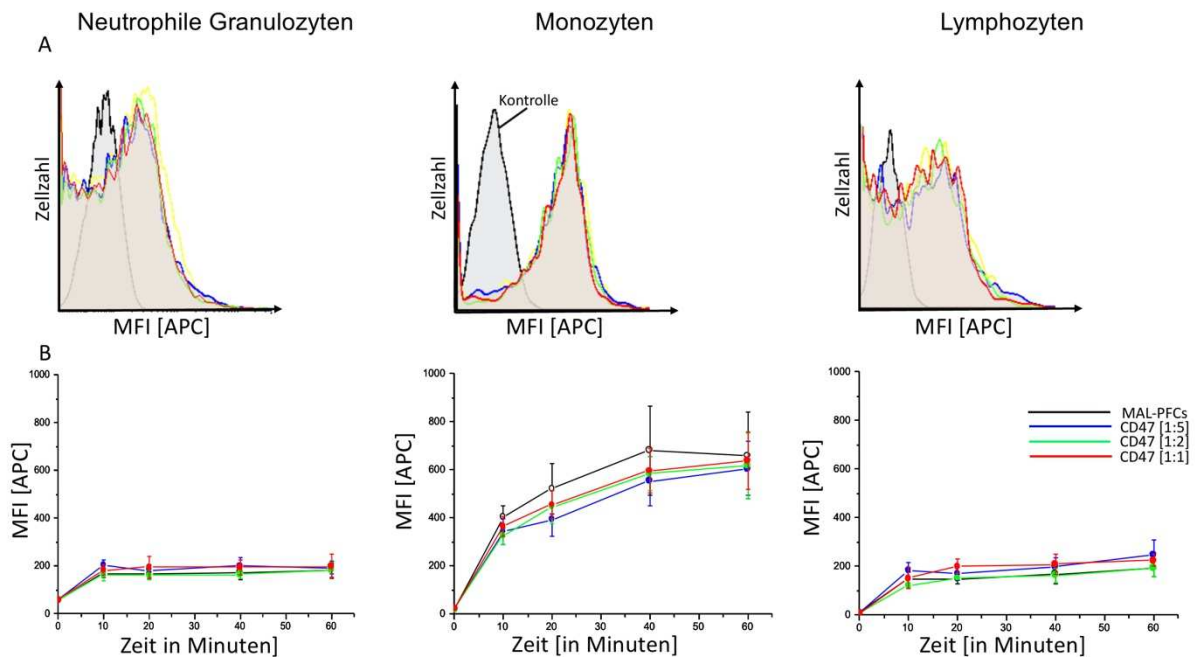


Abb. 18: Zeitkinetik der zellulären Aufnahme von CD47 PFCs

A: Die Histogramme stellen die zelluläre Aufnahme der Immunzellen zum Zeitpunkt von 60 Minuten im Vergleich zu der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 (schwarz) dar. Abgebildet sind Mittelwerte mit SD von $n=5$ unabhängigen Experimenten. **B:** Abgebildet ist die zelluläre Aufnahme von CD47 PFCs durch neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in einer Zeitkinetik (0, 10, 20, 40 und 60 Minuten). Der schwarze Graph zeigt die mittlere Fluoreszenzstärke der Kontroll-Emulsion (MAL PFCs) der blaue Graph das Fluoreszenzsignal bei einer CD47 Konzentration von 1:5, der grüne Graph von 1:2 und der rote Graph von 1:1. Es wurden Mittelwerte mit SD von $n=5$ unabhängigen Experimenten dargestellt.

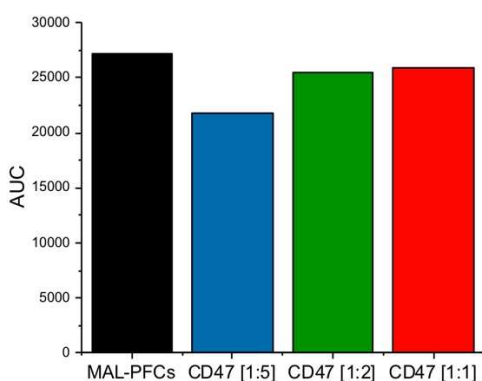


Abb. 19: AUC der zellulären Aufnahme von CD47 PFCs durch Monozyten

Abgebildet sind die berechneten Werte der AUC des Monozyten-Graphen aus Abbildung 18B. Das Balkendiagramm verdeutlicht mit den AUC-Werten, dass vor allem bei einer CD47-Peptid Konzentration von 1:5 das Signal in den Monozyten niedriger ist (blauer Balken). Die AUC-Werte der 1:2 und 1:1 CD47-Konzentration (grüner und roter Balken) sind nur wenig reduziert im Vergleich zu der Kontrolle (schwarzer Balken)

4.5.6 Aktives Neutrophilentargeting in Kombination mit CD47

In dem vorherigen Experiment zur passiven zellulären Aufnahme von CD47-Targetingemulsionen durch humane Immunzellen (Abschnitt 4.5.5) konnte eine leichte Reduktion der phagozytischen Aufnahme von MAL-PFCs durch Monozyten nach Kopplung des CD47-Peptids beobachtet werden. Im nächsten Schritt wurde daher eine Kombination aus CD47 und dem neutrophilenspezifischen hN-Peptid eingesetzt, um sowohl die unspezifische Aufnahme durch Monozyten weiter zu reduzieren als auch die Targetingspezifität der Neutrophilen zu erhöhen. Hierfür wurden MAL-PFCs zunächst mit dem Neutrophilenpeptid funktionalisiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen des CD47 (1:5, 1:2 und 1:1) kombiniert.

4.5.7 Charakterisierung der $^{CD47|hN}$ PFCs

Die Charakterisierung der hN/CD47-funktionalisierten-PFCs erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung hinsichtlich Partikelgröße, Polydispersitätsindex (PDI) und Zeta-Potential im Vergleich zu den MAL-PFCs. In Abbildung 20 zeigt sich, dass sowohl MAL-PFCs als auch die hN/CD47-funktionalisierten-PFCs eine vergleichbare mittlere Partikelgröße von 140 nm aufweisen. Der PDI war bei den Targetingemulsionen mit einem Mittelwert von etwa 0,15 im Vergleich zu den MAL-PFCs leicht reduziert. Das Zeta-Potential der $^{CD47|hN}$ PFCs war deutlich negativer und lag im Mittel bei ungefähr -42 mV, wohingegen die MAL-PFCs einen mittleren Wert von -28 mV aufwiesen.

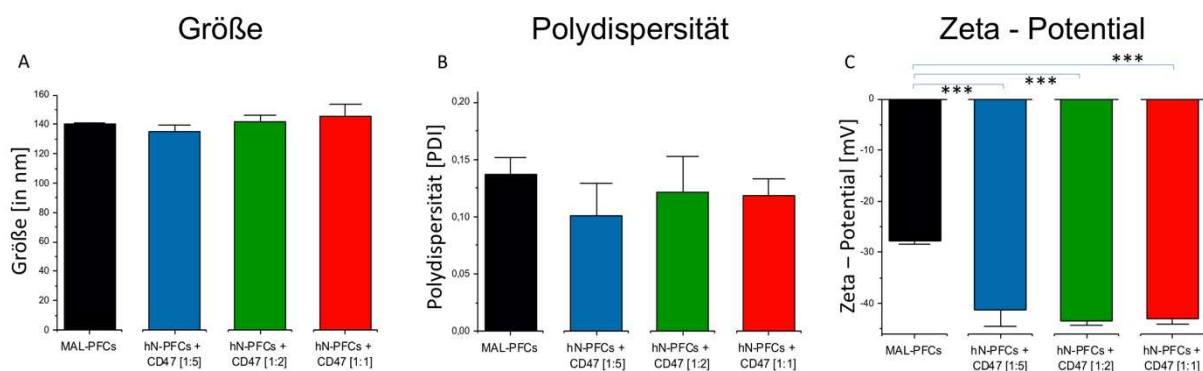


Abb. 20: Charakterisierung MAL-PFCs und Targeting-PFCs ($^{CD47|hN}$ PFCs)

Dargestellt sind von links nach rechts die mittlere Partikelgröße (in nm), der Polydispersitätsindex (PDI) und das Zeta-Potential (in mV) von MAL-PFCs und hN-PFCs + CD47 (1:5, 1:2 und 1:1 CD47 Konzentration). Die Partikelgröße ist bei den MAL-PFCs und den Targeting-PFCs ($^{CD47|hN}$ PFCs) nahezu gleich groß. Der PDI ist bei den Targeting-PFCs ($^{CD47|hN}$ PFCs) im Mittel etwas kleiner, das Zeta Potential hingegen negativer. Abgebildet sind Mittelwerte und SD von n = 3 unabhängigen Experimenten. *** = p < 0,001 [Signifikanztest mittels One-Way ANOVA].

4.5.8 Zelluläre Aufnahme der Targetingemulsionen

Im abschließenden Versuch dieser Arbeit wurde die zelluläre Aufnahme der ^{64}Cu -PFCs in humane Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) *ex vivo* untersucht. Die Analyse der Proben erfolgt mittels Durchflusszytometrie (Abb. 21). Das Fluoreszenzsignal in Monozyten und Lymphozyten zeigte für die verschiedenen Targetingemulsionen (^{64}Cu -PFCs+CD47) keinen relevanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (^{64}Cu -PFCs). Eine zusätzliche Reduktion der phagozytischen Aufnahme durch Monozyten war nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich in neutrophilen Granulozyten ein verstärktes Fluoreszenzsignal bei allen drei getesteten CD47-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle, was auf eine erhöhte zelluläre Aufnahme und dadurch Verstärkung des aktiven Targetings hindeutet.

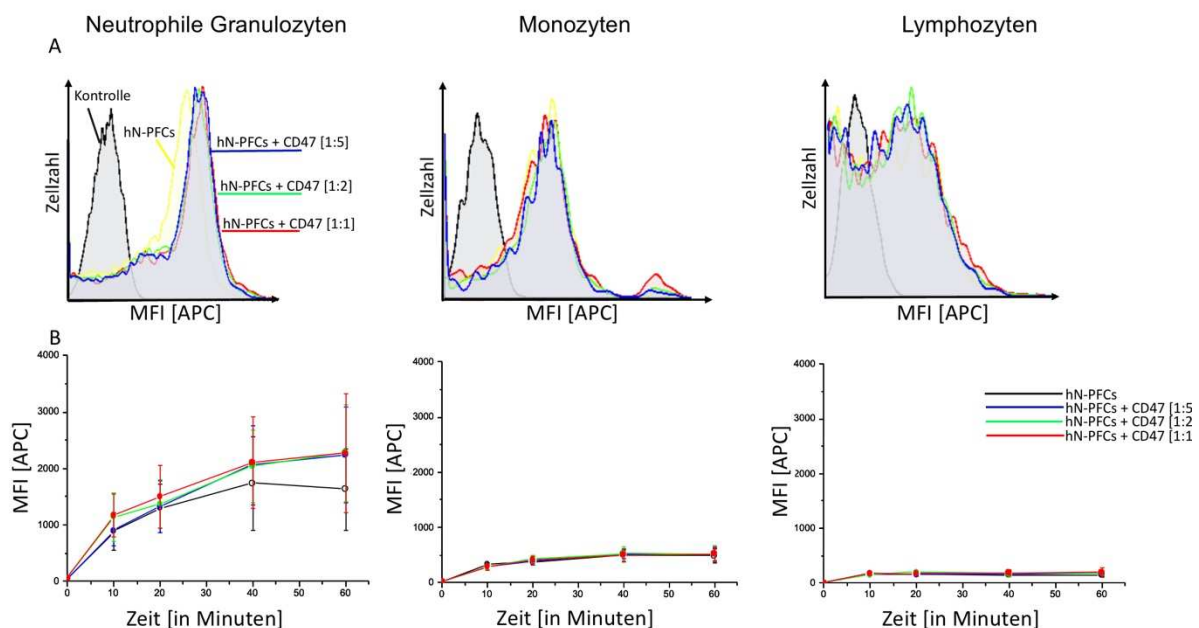


Abb. 21: Zeitkinetik der zellulären Aufnahme von ^{64}Cu -PFCs

A: Die Histogramme stellen die zelluläre Aufnahme der Immunzellen zum Zeitpunkt von 60 Minuten im Vergleich zu der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 (schwarz) dar. **B:** Dargestellt ist die zelluläre Aufnahme (Fluoreszenzsignal APC) der Targetingemulsionen von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten in einer Zeitkinetik (0, 10, 20, 40 und 60 Minuten). Der schwarze Graph zeigt das mittlere Fluoreszenzsignal der NG2-gekoppelten Emulsion (ohne CD47-Peptid), der blaue Graph das Fluoreszenzsignal bei einer CD47 Konzentration von 1:5, der grüne Graph von 1:2 und der rote Graph von 1:1. Im linken Graphen (neutrophile Granulozyten) erkennt man ein stärkeres mittleres Fluoreszenzsignal mit steigender Menge an CD47-Peptid im Vergleich zu der Kontrolle. In den Monozyten und Lymphozyten ist kein Unterschied zwischen Kontrolle und CD47 Zugaben ersichtlich. Es wurden Mittelwerte mit SD dargestellt, n=5 unabhängigen Experimenten.

5. DISKUSSION

Die Bildgebung nimmt in der modernen Medizin eine zentrale Rolle in der Diagnostik und auch in der Therapie ein. Besonders die spezifische Darstellung von Entzündungsprozessen stellt jedoch weiterhin eine Herausforderung dar, da herkömmliche Kontrastmittel, wie beispielsweise Gadolinium oder SPIOs, in inflammatorischem Gewebe häufig zu unspezifischen Signalveränderungen führen. SPIOs sind superparamagnetische Eisenoxidpartikel, die von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden, insbesondere von Makrophagen und Monozyten, aber auch von anderen phagozytierenden Zellen [85-88]. Die fehlende Zellspezifität führt dazu, dass das detektierte Signal nicht eindeutig einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden kann, was eine Interpretation von Entzündungsprozessen erschwert [89-91]. Zusätzlich führen SPIOs durch ihre Eisenpartikel zu starken Signalabschwächungen in der MRT, welche sich als „*black holes*“ darstellen und eine eindeutige Quantifizierung limitieren. Darüber hinaus führt die Partikelgröße der SPIOs zu einer verstärkten Opsonierung durch Plasmaproteine, was wiederum eine schnelle Erkennung und Elimination durch phagozytierende Zellen zur Folge hat [85].

Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) stellen hierbei einen vielversprechenden Ansatz dar, da sie ebenfalls über passive Phagozytose von Immunzellen aufgenommen werden, jedoch im Gegensatz zu SPIOs eine hochspezifische und hintergrundfreie Detektion mittels ^{19}F -MRT ermöglichen. Da im menschlichen Körper nahezu kein Fluor vorkommt, entsteht kein endogenes Hintergrundsignal, wodurch eine eindeutige Zuordnung und Quantifizierung der Zellen möglich ist [47, 48].

Vor dem Hintergrund, dass die zelltypspezifische Bildgebung und Therapie zunehmend an Bedeutung gewinnen, wurde in dieser Arbeit primär die gezielte Darstellung neutrophiler Granulozyten untersucht. Da neutrophile Granulozyten zu den ersten Immunzellen gehören die in das inflammatorische Gewebe migrieren, eignen sie sich besonders gut für eine frühzeitige Diagnostik von Entzündungsherden [92].

Für eine spezifische Bildgebung ist es daher erforderlich, die unspezifische Aufnahme der PFCs insbesondere durch Monozyten und Lymphozyten zu reduzieren und gleichzeitig die Aufnahme in neutrophilen Granulozyten gezielt zu steigern.

Zur Umsetzung dieses Ansatzes wurden in dieser Arbeit mehrere etablierte Strategien untersucht. Zum einen erfolgte eine PEGylierung der Nanoemulsionen zur Reduktion

der unspezifischen zellulären Aufnahme. Zum anderen wurde eine Oberflächenmodifikation der PFCs mittels eines CD47-Peptids zur gezielten Inhibition der Phagozytose eingesetzt. Beide Ansätze dienen der Ausbildung sogenannter „*stealth*“-Eigenschaften, um eine Abschirmung gegenüber phagozytierenden Zellen zu erreichen. Darüber hinaus wurde ein aktives Targeting mittels eines neutrophilenspezifischen Peptids (hN) verwendet, um die selektive Aufnahme in neutrophile Granulozyten zu fördern. Die Strategien wurden sowohl einzeln als auch in Kombination untersucht.

5.1 PFC-Eigenschaften beeinflussen die passive zelluläre phagozytische Aufnahme

Perfluorkarbonate sind vollständig mit Fluor substituierte Kohlenstoffverbindungen. In dieser Arbeit wurde Perfluor-15-kronen-5-ether (PFCE) verwendet, welches aufgrund seiner zyklischen Struktur und gleichmäßigen Anordnung der Fluoratome besonders gut für die MR-Bildgebung geeignet ist. Ein wesentlicher Nachteil der Perfluorkarbonate ist ihre ausgeprägte Hydrophobie, wodurch sie nicht direkt für die medizinische Anwendung nutzbar sind. Aus diesem Grund werden sie in Form von Nanoemulsionen eingesetzt [52]. In dieser Arbeit wurde Lipoid S75 als Emulgator verwendet, um stabile PFC-Nanoemulsionen herzustellen. Zur Fluoreszenzmarkierungen wurde ATTO647-DPPE bereits während der Herstellung in die Nanoemulsion integriert. Die Verwendung dieses Fluorochroms ist etabliert und wurde bereits 2010 von Srinivas et al. beschrieben. Hier wurden die verwendeten PFC-Nanoemulsionen mit ATTO647 markiert [93].

Die in dieser Arbeit untersuchten Perfluorkarbon-Nanoemulsionen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zeta-Potentials charakterisiert. Dabei wurden alle hergestellten Nanoemulsionen (PFCs, ^{MAL}PFCs, ^{PEG}PFCs, ^{CD47}PFCs, ^{hN}PFCs und ^{CD47|hN}PFCs) miteinander verglichen. Die mittlere Partikelgröße aller untersuchten Ansätze lag im Bereich von 125-150 nm. Für eine intravenöse Anwendung der Nanoemulsionen ist eine Partikelgröße von unter 200 nm notwendig, um eine freie Passage durch das Gefäß zu ermöglichen und das Risiko für Gefäßverschlüsse und Embolien zu minimieren [51]. Darüber hinaus zeigen Studien, dass größere Partikel tendenziell effektiver von Zellen aufgenommen werden als kleinere Partikel [94-96]. Das lässt darauf schließen, dass eine kleinere Partikelgröße für ein aktives Targeting von neutrophilen Granulozyten wirksamer ist, da die

unspezifische phagozytische Aufnahme durch andere Immunzellen erst mit zunehmender Partikelgröße effizienter ist. Neben der Partikelgröße wurde auch der Polydispersitätsindex untersucht, er beschreibt die Größenverteilung innerhalb einer Probe. Dieser lag im Mittel bei etwa 0,12-0,17 und weist auf eine nahezu monodisperse Verteilung der PFCs hin, was in der Literatur als vorteilhaft für Nanoemulsionen bewertet wird [97]. Das Zeta-Potential beschreibt die Oberflächenladung der Partikel und lag in der Arbeit im Bereich von -20 mV bis -50 mV. Stärker negativ geladene Partikel erhöhen die Stabilität der Dispersion der Nanoemulsion durch elektromechanische Abstoßung wohingegen positivere Werte zu einer Aggregation und Koaleszenz führen [98, 99]. Die in dieser Arbeit stärker negativen Zeta-Potentiale sprechen für eine hohe Stabilität der Nanoemulsionen [100, 101]. Abschließend ist festzuhalten, dass eine Optimierung der Herstellungsbedingungen sowie die anschließende Charakterisierung der Nanoemulsionen wichtig waren, um eine einheitliche und reproduzierbare Basis für alle Experimente zu schaffen. Dadurch wird sichergestellt, dass die Nanoemulsionen unter vergleichbaren Bedingungen hergestellt wurden und auch die gemessenen Werte weitgehend mit den in der Literatur beschriebenen übereinstimmen.

5.2 PEGylierung von PFCs reduziert die unspezifische zelluläre

Aufnahme

Die PEGylierung ist eine etablierte Methode zur Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln, um deren Interaktion mit Immunzellen zu reduzieren. Ziel dieses Abschnittes war es den Einfluss der PEGylierung auf die unspezifische zelluläre Aufnahme von PFC-Nanoemulsionen zu untersuchen.

Abuchowki und Davis konnten bereits 1977 die Wirkung von PEG nachweisen. Dabei koppelte Abuchowski Polyethylenglykol kovalent an bovines Serumalbumin und injizierte dieses anschließend in Kaninchen, mit dem Effekt, dass das Protein durch die PEGylierung seine Immunität verlor [102]. Im Jahre 1993 griff Blume dieses Konzept auf und revolutionierte die PEGylierung entscheidend, indem er die *stealth*-Eigenschaften und das aktive Targeting von Nanopartikeln näher beschrieb [103].

Zur Untersuchung der passiven zellulären Aufnahme wurden nicht-modifizierte, unPEGylierte PFCs sowie PEGylierte PFCs *ex vivo* mit frisch isolierten humanen Immunzellen bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die unPEGylierten PFCs insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Monozyten phagozytiert werden. Im

Gegensatz dazu konnte bei den PEGylierten PFCs, in Übereinstimmung mit der Literatur, signifikant eine reduzierte Aufnahme beobachten werden, insbesondere in Monozyten. Die stärkste Reduktion wurde bei einer PEGylierung von 10 % und 20 % beobachtet, wobei zwischen beiden Konzentrationen kaum ein Unterschied festzustellen war, obwohl die Konzentration des PEGs verdoppelt wurde. Dies bestätigt die Annahme, dass die PEG-Ketten vor allem bei optimaler PEG-Dichte den besten *stealth*-Effekt erreichen [61, 62, 104, 105]. Der sterische Effekt der PEG-Ketten spielt dabei eine zentrale Rolle. Bei zu geringer Dichte <5 % PEG liegen die PEG-Ketten in einer sogenannten „*mushroom*“-Konfiguration vor, jedoch sind in dieser Konformation die einzelnen PEG-Ketten zu weit voneinander entfernt, um optimal abzuschirmen, sodass Opsonine noch binden können. Die optimale Dichte liegt im Übergangsbereich bei 7 ± 2 %. Darüber hinaus, in der sogenannten „*dense brush*“-Konfiguration mit noch höherer Dichte ist der Schutz zwar hoch, aber es kommt zu mechanischen oder funktionellen Einschränkungen, da die Ketten an Flexibilität verlieren [106, 107]. Dies spricht dafür, dass bereits bei 10 % eine optimale Abschirmung erreicht wird. Ein anderer zentraler Bestandteil des *stealth*-Effekts stellt die Ausbildung einer Hydrathülle durch PEGs dar. Durch die starke Hydrophilie, der nach außen ragenden PEG-Ketten werden über Wasserstoffbrückenbindungen Wassermoleküle gebunden, was zu einer beweglichen und gleichzeitig dichten Hydrathülle führt. Die Hydrathülle fungiert als Barriere für Plasmaproteine und stabilisiert gleichzeitig. Auch hier gilt, dass in der PEG-Ketten Konformation zwischen „*mushroom*“ und „*dense brush*“-Typ die optimale Hydrathülle ausgebildet werden kann. Beide Effekte wirken zusammen synergistisch und verstärken sich gegenseitig [108-110].

In dieser Arbeit ist das ζ -Potential durch PEGylierung mit Cholesterol-PEG negativer geworden. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme von -20 mV auf -37 mV. Dies steht im Gegensatz zu vielen Literaturangaben, in denen eine PEGylierung eher mit einer Reduktion der negativen Oberflächenladung einhergeht, da PEG selber auch neutral ist. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte eine strukturelle Veränderung der Emulsionsoberfläche durch Cholesterol-PEG sein, wodurch es zu einer Zunahme der Negativierung des ζ -Potentials kommt. Trotz dieser Veränderung bleibt der *stealth*-Effekt erhalten, was darauf hindeutet, dass sterische und sterodynamische Effekte hier dominieren.

5.3 Gesteigerte gezielte zelluläre Aufnahme in neutrophile Granulozyten durch Targeting-Emulsionen

Ziel dieses Abschnitts war es, die Effizienz eines aktiven Targetings auf neutrophile Granulozyten mittels eines neutrophilen-spezifischen Peptids zu untersuchen und dessen Effekt auf die zelluläre Aufnahme von PFCs zu bewerten. Hierfür wurde ein neutrophilenspezifisches Peptid (hN-Peptid) verwendet, dessen Sequenz bereits 1999 das erste Mal mittels Phagendisplay von Mazzucchelli beschrieben wurde [77]. Das Neutrophilenpeptid wurde so modifiziert, dass eine Kopplung mit den PFCs möglich ist. Hierfür wurde das Peptid N-terminal mit einem Carboxyfluorescein und C-terminal mit einer Cystein-Gruppe versehen, was eine Thiol-Maleimid-Kopplung an die PFCs ermöglicht. Neben Peptiden stehen auch Antikörper und Antikörperfragmente für ein zelltypspezifisches Targeting zur Verfügung. Diese sind jedoch häufig mit unerwünschten Effekten assoziiert. Insbesondere bei Antikörpern kann es zu einer Aktivierung des Komplementsystems kommen, was ihren Einsatz einschränken kann [111].

Das Neutrophilenpeptid hN bindet spezifisch an CD177, auch bekannt als humanes Neutrophilen-Antigen (HNA-2a, NB1), ein 1971 erstmals beschriebenes Glykoprotein, welches selektiv auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird [78, 79, 112-114]. Neutrophile Granulozyten können in CD177⁺- und CD177⁻-Subpopulationen unterteilt werden [115]. Etwa 97% der gesunden Bevölkerung besitzen CD177⁺ Neutrophile, wobei CD177⁺ Menschen sowohl CD177⁺ als auch CD177⁻ Neutrophile aufweisen [116]. Unter physiologischen Bedingungen liegt der Anteil CD177⁺-Neutrophiler bei etwa 45-65 %, kann aber interindividuell stark variieren [117-119]. Im Rahmen von Inflammationsprozessen kann der Anteil an CD177⁺ Neutrophilen signifikant ansteigen [120, 121]. Trotz ähnlicher Morphologie zeigen CD177⁺ und CD177⁻ neutrophile Granulozyten Unterschiede in ihrer Genexpression und Funktionalität [118]. So zeigen CD177⁺ Neutrophile beispielsweise im Rahmen von Entzündungsprozessen eine erhöhte Migrationsfähigkeit sowie eine verstärkte Freisetzung von Entzündungsmediatoren, was ihre zentrale Rolle in Inflammationsprozessen unterstreicht [122].

Zur Untersuchung des kombinierten Effektes von aktivem Targeting und PEGylierung wurden die PFCs neben der Kopplung des CD177-bindenden Neutrophilenpeptids zusätzlich mit Cholesterol-PEG in unterschiedlichen Konzentrationen (5 mol%, 10 mol% und 20 mol%) modifiziert. Nach Inkubation der funktionalisierten PFCs mit

isolierten humanen Immunzellen zeigte sich wie erwartet eine deutlich erhöhte Aufnahme der Targetingemulsionen in neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Monozyten und Lymphozyten. Diese Ergebnisse bestätigen die Effektivität des aktiven Targetings über das CD177-bindende Peptid, das die Aufnahme internalisiert. Mit zunehmender PEG-Konzentration nahm jedoch die zelluläre Aufnahme in allen Immunzellen ab, sodass auch das aktive Targeting bei höherer PEGylierung deutlich reduziert wurde. Das deutet darauf hin, dass der *stealth*-Effekt der PEGylierung nicht selektiv ist und somit auch die Effizienz des aktiven Targetings beeinträchtigt. Somit zeigt sich, dass eine Balance zwischen ausreichender Abschirmung unspezifischer Interaktionen und der Aufrechterhaltung einer effektiven Rezeptorbindung entscheidend für die Optimierung solcher Nanopartikel ist.

5.4. CD47 reduziert die zelluläre Aufnahme von Monozyten

Da die PEGylierung allein nicht ausreicht, um die unspezifische Phagozytose vollständig zu reduzieren, wurde in diesem Teil die Funktionalisierung der Nanoemulsionen mit CD47 untersucht. Die CD47-basierte Oberflächenmodifikation stellt einen alternativen Ansatz dar die Phagozytose gezielt zu hemmen. CD47 ist ein membranständiges Protein, das durch Bindung an SIRP α -Rezeptoren auf Phagozyten ein inhibitorisches Signal vermittelt („*don't eat me*“-Signal) und somit die Phagozytose hemmt [83, 84]. Das bietet eine zusätzliche Möglichkeit zur Verlängerung der Zirkulationszeit von Nanopartikeln im Blutkreislauf [68, 69, 84]. Die Funktionalisierung von Biomaterialien mit CD47 hat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits vielversprechende und signifikante Ergebnisse hinsichtlich einer reduzierten Aufnahme durch Makrophagen gezeigt [74, 83, 123, 124]. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von CD47 auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten genauer untersucht. Das CD47 als Mimikry-Peptid stellt eine gute Alternative zum ganzen Protein dar. Es handelt sich dabei um eine kurze Aminosäuresequenz, die Eigenschaften des CD47 Proteins, wie beispielsweise Rezeptorbindung oder Zellsignale, imitiert. Der Einsatz solcher Mimikry-Peptide bietet mehrere Vorteile, unter anderem weniger Produktionskosten, eine leichtere Kopplung an Nanopartikel Oberflächen, bessere Modifizierbarkeit und eine höhere Biokompatibilität [125-127]. In dieser Arbeit wurde auch hier mit einem CD47 Peptid von Genaxxon mit einer Reinheit von >70 % gearbeitet.

Zunächst wurde die physiologische Expression von CD47 auf den in dieser Arbeit untersuchten Immunzellpopulationen: neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten analysiert. Hierfür wurde ein CD47-spezifischer Antikörper verwendet, dessen Bindung mittels Durchflusszytometrie visualisiert werden konnte. Dabei zeigte sich eine ausgeprägte Expression des CD47 auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten, während Lymphozyten eine geringere Expression aufweisen. Zur Untersuchung einer möglichst optimalen Konzentration des CD47-Antikörpers wurden zunächst drei Verdünnungen getestet (1:100, 1:200 und 1:500). Mit steigender CD47-AK Konzentration nahm das gemessene Signal zu, weshalb für diesen und den folgenden Versuch mit einer Konzentration von 1:100 gearbeitet wurde.

Aufbauend darauf wurde im Anschluss die Expression des SIRP α -Rezeptors auf denselben drei Immunzellpopulationen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) untersucht. Bereits im Jahre 1998 fand Adams et al. [70] heraus, dass der SIRP α -Rezeptor auch auf myeloischen Zellen wie Monozyten, Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen vorkommt. Hier zeigte sich insbesondere in Monozyten die stärkste SIRP α -Expression, gefolgt von neutrophilen Granulozyten während Lymphozyten nur eine geringe Expression aufwiesen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine CD47-Funktionalisierung der PFC-Nanoemulsionen besonders in Monozyten eine hemmende Wirkung auf die Phagozytose entfalten könnte und somit zu einer Reduktion der unspezifischen zellulären Aufnahme in dieser Zellpopulation führt. Gleichzeitig zeigen die Daten, dass auch neutrophile Granulozyten, wenn auch moderat, eine Expression des SIRP α -Rezeptors aufweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass das vermittelte „*don't eat me*“-Signal nicht nur auf Monozyten wirkt, sondern auch die Aufnahme durch Neutrophile beeinflussen kann. Zusätzlich weist die vorhandene Streuung der Messwerte auf eine donor-spezifische Expression des SIRP α -Rezeptors hin. Daraus ergibt sich, dass das Ansprechen auf eine CD47-Funktionalisierung interindividuell variieren kann. Diese Überlegungen zeigen, dass eine CD47-basierte Oberflächenmodifikation zwar eine effektive Methode zur gezielten Reduktion der unspezifischen zellulären Aufnahme darstellt, jedoch keine vollständige Zelltypspezifität erreicht wird.

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss unterschiedlicher CD47-Konzentrationen auf die zelluläre Aufnahme der Nanoemulsionen untersucht. Hierfür wurden drei Ansätze mit den Verhältnissen 1:1, 1:2 und 1:5 sowie eine Kontroll-Emulsion ohne CD47 verglichen. Die Ergebnisse des Inkubationsversuchs zeigen, dass die CD47-

Funktionalisierung zu einer leichten Reduktion der phagozytischen Aufnahme in Monozyten führt. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei einem Verhältnis von 1:5. Ein Verhältnis von 1:5 bedeutet, dass eine von fünf vorhandenen Maleimid-Bindungsstellen mit dem CD47-Peptid gekoppelt wurde. Das lässt darauf schließen, dass bereits eine partielle Belegung der verfügbaren Maleimid-Bindungsstellen mit CD47 ausreicht, um einen hemmenden Effekt auf die Phagozytose zu erreichen. Das steht im Einklang mit der bekannten Funktion von CD47 als inhibitorisches Signal für phagozytische Zellen, insbesondere von Makrophagen [123, 124]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten kein relevanter Unterschied in der Aufnahme zwischen den CD47-funktionalisierten PFCs und der Kontrollemulsion. Dies legt nahe, dass das CD47-Peptid keinen maßgeblichen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme in diesen Zellpopulationen ausübt. Die Ergebnisse bestätigen somit die zugrunde liegende Hypothese, wonach das CD47-Peptid die unspezifische Aufnahme durch Monozyten reduziert, während die Aufnahme in neutrophile Granulozyten weitgehend unbeeinflusst bleibt.

5.5 Kombination von CD47 und aktivem Targeting führt zu komplexen Wechselwirkungen der Oberflächenmodifikation

Im nächsten Schritt wurde der *stealth*-Effekt des CD47 Peptids mit dem aktiven Targeting von Neutrophilen kombiniert, um eine möglichst selektive Aufnahme der PFCs in neutrophile Granulozyten zu erreichen. Hierfür wurde zunächst das Neutrophilenpeptid im Verhältnis 1:5 an die Maleimid-Gruppen der ^{MAL}PFCs gekoppelt und im Anschluss eine zusätzliche Kopplung mit dem CD47-Peptid in den bereits in 5.3 untersuchten Konzentrationen (1:5, 1:2 und 1:1) durchgeführt. Entgegen den Erwartungen führte die Funktionalisierung mit CD47 in den Ergebnissen nicht zu einer reduzierten Aufnahme in Monozyten oder Lymphozyten. Demgegenüber zeigte sich in neutrophilen Granulozyten bei allen drei getesteten CD47-Konzentrationen ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Kontrollemulsion ohne CD47. Das weist auf eine gesteigerte zelluläre Aufnahme und somit auf eine Verstärkung des aktiven Targetings hin. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den vorherigen Untersuchungen sowie den zugrunde liegenden biologischen Mechanismen. Basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 5.3 wäre zu erwarten gewesen, dass die CD47-Funktionalisierung insbesondere die Aufnahme in Monozyten reduziert, während die Aufnahme in neutrophilen Granulozyten unverändert oder leicht

vermindert bleibt. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die Reihenfolge der Kopplung sein. Im Versuch wurde zunächst das Neutrophilenpeptid (hN) in einer Konzentration von 1:5 an die PFCs gekoppelt, für die anschließende CD47-Kopplung könnte die Verfügbarkeit freier Maleimid-Gruppen hierdurch eingeschränkt gewesen sein. Dies könnte dazu geführt haben, dass das CD47-Peptid nicht suffizient an die Emulsionsoberfläche binden konnte und der erwartete *stealth*-Effekt somit ausbleibt. Unklar bleibt dennoch die beobachtete Steigerung der Aufnahme in neutrophile Granulozyten durch das CD47-Peptid. Dieser Effekt scheint paradox, da selbst bei reduzierter CD47-Kopplung nicht zu erwarten wäre, dass die Aufnahme höher ausfällt als bei einem alleinigen aktiven Targeting durch das Neutrophilenpeptid.

Neben der Reihenfolge der Kopplung könnte die Reinheit des CD47 Peptids einen limitierenden Faktor darstellen. Die eingeschränkte Reinheit bei der Herstellung von Peptiden ist ein bekanntes Problem. Gerade die Herstellung von Peptiden durch die Festphasen-Peptidsynthese (SPSS) ist bekannt für das Auftreten von Nebenreaktionen. SPSS wurde 1963 erstmals von Merrifield [128] ausführlich beschrieben, durch eine schrittweise Synthese von Peptiden kann es zu Nebenreaktionen wie Deletionssequenzen, Racemisierung, Aggregation oder Oxidation kommen [129, 130]. Das in dieser Arbeit verwendete CD47-Peptid von der Firma Genaxxon weist eine Reinheit von >70 % auf. Die durch Nebenreaktionen bei der Peptidsynthese entstandenen Nebenprodukte könnten die Bindung an den SIRP α -Rezeptor beeinträchtigen oder die nachgeschaltete Signaltransduktion stören. Normalerweise bindet CD47 über seine Ig-Domäne an die N-terminale Ig-Domäne des SIRP α -Rezeptors. Dies führt zu einer Aktivierung einer hemmenden Signaltransduktion über Tyrosin-Phosphorylierung und Aktivierung der SRC-homologen Phosphatasen SHP-1 und SHP-2. Diese wirken inhibitorisch auf die Zellaktivierung und resultieren in einem „*don't eat me*“-Signal. Kommt diese Bindung nur unzureichend zustande bleibt die inhibitorische Signalweiterleitung aus und ein „*don't eat me*“-Signal wird nicht vermittelt [131, 132]. Das resultiert darin, dass die Phagozytose nicht effektiv unterbunden oder gehemmt wird.

Ein weiterer kritischer methodischer Aspekt betrifft die Fluoreszenzmarkierung. Die Kopplung des CD47-Peptids an ein Fluorochrom erwies sich technisch als anspruchsvoll, was bei der Herstellung von Peptiden nicht ungewöhnlich ist. In der Folge waren sowohl das CD47-Peptid als auch das Neutrophilenpeptid mit demselben Fluorochrom (FITC) markiert. Aus diesem Grund wurden beide Signale im gleichen

Detektionskanal erfasst, sodass keine eindeutige Differenzierung zwischen beiden Peptiden möglich war und keine separaten Kontrollen durchgeführt werden konnten. In Zukunft wäre es daher gut diese beiden Peptide mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern zu versehen, um die Kopplung besser analysieren zu können. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Strategien zur Optimierung von PFC-Nanoemulsionen untersucht. Die PEGylierung stellt eine effektive Methode zur Reduktion der unspezifischen zellulären Aufnahme, insbesondere in Monozyten dar. Das aktive Targeting mittels neutrophilenspezifischem hN-Peptid konnte die Aufnahme in neutrophile Granulozyten gezielt steigern. Die Kombination aus aktivem Targeting und PEGylierung führte neben einer Reduktion der unspezifischen zellulären Aufnahme auch zu einer verminderten spezifischen Aufnahme und somit zu einer Abschwächung des aktiven Targetings. Die Oberflächenmodifikation mittels des CD47-Peptids führte zu einer moderaten Reduktion der Aufnahme in Monozyten, während die Reduktion in neutrophilen Granulozyten nur gering ausgeprägt war. Eine wesentliche Limitation dieser Strategie ist die donor- und zellspezifische Variabilität der SIRP α -Expression. So ist die Expression des CD47-Rezeptors auf Monozyten am stärksten vorhanden, jedoch gibt es interindividuelle Unterschiede, was die Wirksamkeit des CD47-vermittelten Effekts einschränken kann. Die Kombination der untersuchten Methoden führte nicht zu einem synergistischen Effekt, sondern zeigt vielmehr die komplexen Wechselwirkungen zwischen aktivem Targeting und *stealth*-Mechanismen. Die Ergebnisse verdeutlichen wie wichtig die Feinabstimmung zwischen Reduktion unspezifischer Aufnahme und gleichzeitig gezielter zellulärer Aufnahme durch Targeting-Mechanismen für eine Optimierung von PFC-Nanoemulsionen in der Bildgebung ist.

5.6 Limitation und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit und auch die in der Literatur beschriebenen Forschungen zeigen, dass die Optimierung von PFCs zur gezielten und spezifischen Bildgebung von neutrophilen Granulozyten in Entzündungsprozessen ein großes Potential haben. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit vielversprechend sind, sind einige Limitationen zu berücksichtigen.

Ein wesentlicher limitierender Faktor ist die Reinheit des verwendeten CD47-Peptids, so konnte aktuell nur eine Reinheit von >70 % erreicht werden. Die entstehenden Nebenprodukte können zum einen die Interaktion mit dem SIRP α -Rezeptor und damit

die spezifische Bindung beeinträchtigen. Zum anderen kann die nachgeschaltete inhibitorische Signaltransduktion abgeschwächt werden und somit die Effektivität der Funktionalisierung einschränken. So könnte zukünftig die Verwendung hochreiner Peptide die CD47-Funktionalisierung optimieren und zu einer verstärkten Reduktion der Phagozytose führen. Ein zusätzlicher limitierender Faktor ist die donor- und zellspezifische Variabilität der SIRP α -Expression. Trotz der stärksten Expression des CD47-Rezeptors (SIRP α) auf Monozyten, bestehen interindividuelle Unterschiede, die zu einer variablen Wirksamkeit des CD47-vermittelten Effekts führen können und auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einschränken. Ein weiterer kritischer Punkt war die Verwendung desselben Fluorochroms für das neutrophilenspezifische hN-Peptid und das CD47-Peptid, wodurch separate Kontrollen und eine eindeutige Differenzierung nicht möglich waren. Für präzisere Analysen und Unterscheidungen kann die Verwendung von verschiedenen Fluorochromen in Zukunft von Vorteil sein. Darüber hinaus wird CD177, als Zielstruktur des neutrophilenspezifischen Peptids, nicht auf allen neutrophilen Granulozyten exprimiert, sondern nur zu 45-65% und weist zudem interindividuelle Unterschiede auf [117, 118]. Zwar steigt der Anteil der CD177-positiven neutrophilen Granulozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen signifikant an, dennoch kann dadurch keine einheitliche Zelladressierung gewährleistet werden [120, 121]. Zu berücksichtigen ist auch, dass die Untersuchungen ausschließlich *ex vivo* und nicht *in vivo* durchgeführt wurden, weshalb die Übertragbarkeit nur eingeschränkt möglich ist. Schließlich wird das aktive Targeting und die funktionalisierten PFC-Nanoemulsionen von vielen weiteren Faktoren beeinflusst, wie beispielsweise Blutzusammensetzung oder Entzündungen, gerade in Entzündungsprozessen soll die Optimierung der Nanoemulsionen einen wichtigen Fortschritt für die Bildgebung bringen. Daher könnten zukünftige Projekte diese gewonnen Erkenntnisse verwenden und anhand von *in vivo* Modellen testen. Die Kombination aus PEGylierung und aktivem Targeting zeigen, dass zwischen Reduktion der unspezifischen zellulären Aufnahme und der Aufrechterhaltung eines effizienten aktiven Targetings ein empfindliches Gleichgewicht besteht, da viele Faktoren sich gegenseitig beeinflussen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass eine weitere Optimierung der Oberflächenmodifikation erforderlich ist, um eine noch spezifischere und gezieltere Adressierung neutrophiler Granulozyten zukünftig zu ermöglichen. Dies könnte in der Medizin langfristig zur Verbesserung der Diagnostik entzündlicher Erkrankungen beitragen.

6. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
2. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
3. Lotze, M.T., et al., *The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 60-81.
4. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 158-75.
5. Arslan, F., D.P. de Kleijn, and G. Pasterkamp, *Innate immune signaling in cardiac ischemia*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(5): p. 292-300.
6. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
7. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 159-73.
8. Locati, M., G. Curtale, and A. Mantovani, *Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity*. Annu Rev Pathol, 2020. **15**: p. 123-147.
9. Lameijer, M.A., et al., *Monocytes and macrophages as nanomedicinal targets for improved diagnosis and treatment of disease*. Expert Rev Mol Diagn, 2013. **13**(6): p. 567-80.
10. Shiraishi, M., et al., *Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart*. J Clin Invest, 2016. **126**(6): p. 2151-66.
11. Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 514-25.
12. Mary, J.Y., *Normal human granulopoiesis revisited. II. Bone marrow data*. Biomed Pharmacother, 1985. **39**(2): p. 66-77.
13. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
14. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
15. Bartneck, M. and J. Wang, *Therapeutic Targeting of Neutrophil Granulocytes in Inflammatory Liver Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2257.
16. Molineux, G., *Granulocyte colony-stimulating factors*. Cancer Treat Res, 2011. **157**: p. 33-53.
17. Christopher, M.J., et al., *Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization*. Blood, 2009. **114**(7): p. 1331-9.
18. Eash, K.J., et al., *CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions*. Blood, 2009. **113**(19): p. 4711-9.
19. Hernandez, P.A., et al., *Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 70-4.
20. Honda, M. and P. Kubes, *Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(4): p. 206-221.
21. Kologrivova, I., et al., *Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 664457.
22. Sachs, U.J., et al., *The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23603-12.
23. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
24. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.

25. Kobayashi, S.D., et al., *Neutrophils in the innate immune response*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(6): p. 505-17.
26. Sheppard, F.R., et al., *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(5): p. 1025-42.
27. Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein, *Phagocytosis by neutrophils*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1299-306.
28. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them*. J Vis Exp, 2010(36).
29. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
30. Kasama, T., et al., *Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(3): p. 273-9.
31. Scapini, P., et al., *The neutrophil as a cellular source of chemokines*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 195-203.
32. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-71.
33. Soehnlein, O., C. Weber, and L. Lindbom, *Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function*. Trends Immunol, 2009. **30**(11): p. 538-46.
34. Kennedy, A.D. and F.R. DeLeo, *Neutrophil apoptosis and the resolution of infection*. Immunol Res, 2009. **43**(1-3): p. 25-61.
35. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 41-50.
36. Chia, S., et al., *Association of leukocyte and neutrophil counts with infarct size, left ventricular function and outcomes after percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2009. **103**(3): p. 333-7.
37. Guasti, L., et al., *Neutrophils and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularisation. A systematic review on more than 34,000 subjects*. Thromb Haemost, 2011. **106**(4): p. 591-9.
38. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. Eur Heart J, 2017. **38**(3): p. 187-197.
39. Ahrens, E.T. and J.W. Bulte, *Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(10): p. 755-63.
40. Gulati, A., et al., *Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy*. JAMA, 2013. **309**(9): p. 896-908.
41. Nakamura, H., et al., *Tumor-detecting capacity and clinical usefulness of SPIO-MRI in patients with hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol, 2000. **35**(11): p. 849-55.
42. Vergauwen, E., et al., *Central nervous system gadolinium accumulation in patients undergoing periodical contrast MRI screening for hereditary tumor syndromes*. Hered Cancer Clin Pract, 2018. **16**: p. 2.
43. Ibrahim, M.A., B. Hazhirkarzar, and A.B. Dublin, *Gadolinium Magnetic Resonance Imaging*, in StatPearls. 2022: Treasure Island (FL).
44. Ahrens, E.T., et al., *In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(8): p. 983-7.
45. Fogel, U., et al., *Noninvasive detection of graft rejection by in vivo (19) F MRI in the early stage*. Am J Transplant, 2011. **11**(2): p. 235-44.
46. Fogel, U., et al., *In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging*. Circulation, 2008. **118**(2): p. 140-8.
47. Yu, J.X., et al., *19F: a versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance*. Curr Med Chem, 2005. **12**(7): p. 819-48.
48. Ruiz-Cabello, J., et al., *Fluorine (19F) MRS and MRI in biomedicine*. NMR Biomed, 2011. **24**(2): p. 114-29.

49. Riess, J.G., *Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2005. **33**(1): p. 47-63.
50. O'Hagan, D., *Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond*. Chem Soc Rev, 2008. **37**(2): p. 308-19.
51. Janjic, J.M. and E.T. Ahrens, *Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009. **1**(5): p. 492-501.
52. Krafft, M.P. and J.G. Riess, *Chemistry, physical chemistry, and uses of molecular fluorocarbon-hydrocarbon diblocks, triblocks, and related compounds--unique "apolar" components for self-assembled colloid and interface engineering*. Chem Rev, 2009. **109**(5): p. 1714-92.
53. Lagaly, G., Schulz, O., & Zimehl, R., *Dispersionen und Emulsionen: Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale*. 2013: Springer-Verlag.
54. Schubert, H., *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*. 1. Auflage ed. 2005, Hamburg: Behr's Verlag.
55. Ebner, B., et al., *Early assessment of pulmonary inflammation by ¹⁹F MRI in vivo*. Circ Cardiovasc Imaging, 2010. **3**(2): p. 202-10.
56. Hertlein, T., et al., *Visualization of abscess formation in a murine thigh infection model of Staphylococcus aureus by ¹⁹F-magnetic resonance imaging (MRI)*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18246.
57. Constantinides, C., et al., *Fast, quantitative, murine cardiac ¹⁹F MRI/MRS of PFCE-labeled progenitor stem cells and macrophages at 9.4T*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0190558.
58. Bisso, P.W., et al., *Nanomaterial Interactions with Human Neutrophils*. ACS Biomater Sci Eng, 2018. **4**(12): p. 4255-4265.
59. Ali, Z., et al., *Multifunctional nanoparticles for dual imaging*. Anal Chem, 2011. **83**(8): p. 2877-82.
60. Temme, S., et al., *Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions*. Circulation, 2015. **131**(16): p. 1405-14.
61. Bhadra, D., et al., *Pegnology: a review of PEG-ylated systems*. Pharmazie, 2002. **57**(1): p. 5-29.
62. Hak, S., et al., *The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging*. ACS Nano, 2012. **6**(6): p. 5648-58.
63. Diaz-Hernandez, M., et al., *PEGylation Strategy for Improving the Pharmacokinetic and Antitumoral Activity of the IL-2 No-alpha Mutein*. Curr Pharm Des, 2023. **29**(44): p. 3579-3588.
64. Harris, J.M., N.E. Martin, and M. Modi, *Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet, 2001. **40**(7): p. 539-51.
65. Knop, K., et al., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(36): p. 6288-308.
66. Brown, E., et al., *Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2785-94.
67. van Duijn, A., S.H. Van der Burg, and F.A. Scheeren, *CD47/SIRPα axis: bridging innate and adaptive immunity*. J Immunother Cancer, 2022. **10**(7).
68. Barclay, A.N. and T.K. Van den Berg, *The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPα) and CD47: structure, function, and therapeutic target*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 25-50.
69. Seiffert, M., et al., *Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3633-43.
70. Adams, S., et al., *Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1853-9.
71. Melo Garcia, L. and F. Barabé, *Harnessing Macrophages through the Blockage of CD47: Implications for Acute Myeloid Leukemia*. Cancers (Basel), 2021. **13**(24).
72. Jaiswal, S., et al., *CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis*. Cell, 2009. **138**(2): p. 271-85.

73. Chao, M.P., et al., *Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1374-84.
74. Majeti, R., et al., *CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells*. Cell, 2009. **138**(2): p. 286-99.
75. Torchilin, V.P., *Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example*. Handb Exp Pharmacol, 2010(197): p. 3-53.
76. Pan, D., et al., *Nanomedicine: perspective and promises with ligand-directed molecular imaging*. Eur J Radiol, 2009. **70**(2): p. 274-85.
77. Mazzucchelli, L., et al., *Cell-specific peptide binding by human neutrophils*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1738-48.
78. Stroncek, D., *Neutrophil-specific antigen HNA-2a (NB1, CD177): serology, biochemistry, and molecular biology*. Vox Sang, 2002. **83 Suppl 1**: p. 359-61.
79. Stroncek, D.F., *Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(6): p. 688-93.
80. Gantert, M., et al., *Receptor-specific targeting with liposomes in vitro based on sterol-PEG(1300) anchors*. Pharm Res, 2009. **26**(3): p. 529-38.
81. Miettinen, H.M., et al., *CD177-mediated nanoparticle targeting of human and mouse neutrophils*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0200444.
82. Franc, G. and A.K. Kakkar, *Diels-Alder "click" chemistry in designing dendritic macromolecules*. Chemistry, 2009. **15**(23): p. 5630-9.
83. Vandchali, N.R., et al., *CD47 Functionalization of Nanoparticles as a Poly(ethylene glycol) Alternative: A Novel Approach to Improve Drug Delivery*. Curr Drug Targets, 2021. **22**(15): p. 1750-1759.
84. Gheibi Hayat, S.M., et al., *Stealth functionalization of biomaterials and nanoparticles by CD47 mimicry*. Int J Pharm, 2019. **569**: p. 118628.
85. Bulte, J.W. and D.L. Kraitchman, *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging*. NMR Biomed, 2004. **17**(7): p. 484-99.
86. Bulte, J.W.M. and H.E. Daldrup-Link, *Clinical Tracking of Cell Transfer and Cell Transplantation: Trials and Tribulations*. Radiology, 2018. **289**(3): p. 604-615.
87. Arbab, A.S., et al., *Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1217-23.
88. Stoll, G. and M. Bendszus, *New approaches to neuroimaging of central nervous system inflammation*. Curr Opin Neurol, 2010. **23**(3): p. 282-6.
89. Muller, K., et al., *Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro*. Biomaterials, 2007. **28**(9): p. 1629-42.
90. Thomas, R., I.K. Park, and Y.Y. Jeong, *Magnetic iron oxide nanoparticles for multimodal imaging and therapy of cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(8): p. 15910-30.
91. Wang, Y.X., S.M. Hussain, and G.P. Krestin, *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. Eur Radiol, 2001. **11**(11): p. 2319-31.
92. Su, Y., et al., *Neutrophils and Macrophages as Targets for Development of Nanotherapeutics in Inflammatory Diseases*. Pharmaceutics, 2020. **12**(12).
93. Srinivas, M., et al., *Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using ¹⁹F MRI and optical imaging*. Biomaterials, 2010. **31**(27): p. 7070-7.
94. Bouvain, P., *Visualisierung spezifischer Zelltypen mittels nicht-invasiver ¹⁹F-MR Bildgebung*. 2018, Heinrich Heine Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
95. Grapentin, C., *Development and in vitro as well as in vivo characterization of perfluorocarbon nanoemulsions for passive or site-specific targeting applications in ¹⁹F magnetic resonance imaging*. 2016.
96. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. J Control Release, 2010. **145**(3): p. 182-95.

97. Patel, S.K., J. Williams, and J.M. Janjic, *Cell Labeling for 19F MRI: New and Improved Approach to Perfluorocarbon Nanoemulsion Design*. Biosensors (Basel), 2013. **3**(3): p. 341-59.
98. Midekessa, G., et al., *Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability*. ACS Omega, 2020. **5**(27): p. 16701-16710.
99. Papadopoulos, S.R.D.a.K.D., *London-vdW and EDL Effects in the Coalescence of Oil Drops*. 1995.
100. Fernandes, D.A., et al., *Synthesis of Stable Multifunctional Perfluorocarbon Nanoemulsions for Cancer Therapy and Imaging*. Langmuir, 2016. **32**(42): p. 10870-10880.
101. Zhou, Z., et al., *Two-stage oxygen delivery for enhanced radiotherapy by perfluorocarbon nanoparticles*. Theranostics, 2018. **8**(18): p. 4898-4911.
102. Abuchowski, A., et al., *Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol*. J Biol Chem, 1977. **252**(11): p. 3578-81.
103. Blume, G., et al., *Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1149**(1): p. 180-4.
104. Georgiev, G.A., et al., *Effects of poly (ethylene glycol) chains conformational transition on the properties of mixed DMPC/DMPE-PEG thin liquid films and monolayers*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **59**(2): p. 184-93.
105. Hak, S., et al., *The effects of oil-in-water nanoemulsion polyethylene glycol surface density on intracellular stability, pharmacokinetics, and biodistribution in tumor bearing mice*. Pharm Res, 2015. **32**(4): p. 1475-85.
106. Garbuzenko, O., Y. Barenholz, and A. Prie, *Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer*. Chem Phys Lipids, 2005. **135**(2): p. 117-29.
107. Labouta, H.I., et al., *Surface-grafted polyethylene glycol conformation impacts the transport of PEG-functionalized liposomes through a tumour extracellular matrix model*. RSC Adv, 2018. **8**(14): p. 7697-7708.
108. Torchilin, V.P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(2): p. 145-60.
109. Suk, J.S., et al., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **99**(Pt A): p. 28-51.
110. Owens, D.E., 3rd and N.A. Peppas, *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. Int J Pharm, 2006. **307**(1): p. 93-102.
111. van der Linden, R.H., et al., *Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1431**(1): p. 37-46.
112. Lalezari, P., G.B. Murphy, and F.H. Allen, Jr., *NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia*. J Clin Invest, 1971. **50**(5): p. 1108-15.
113. Kissel, K., et al., *Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions*. Eur J Immunol, 2001. **31**(5): p. 1301-9.
114. Temerinac, S., et al., *Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2569-76.
115. Dahlstrand Rudin, A., et al., *The neutrophil subset defined by CD177 expression is preferentially recruited to gingival crevicular fluid in periodontitis*. J Leukoc Biol, 2021. **109**(2): p. 349-362.
116. Li, Y., R.M. Schuller, and J. Wu, *An accurate genetic assay to identify human neutrophil antigen 2 deficiency*. Transfus Med, 2023. **33**(1): p. 68-74.
117. Stroncek, D.F., et al., *Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies*. Transfusion, 1996. **36**(2): p. 168-74.
118. Matsuo, K., et al., *Variations in the expression of granulocyte antigen NB1*. Transfusion, 2000. **40**(6): p. 654-62.
119. Gogri, H., et al., *Phenotyping and Genotyping of HNA: Prevalence, Risk of Alloimmunization, and HNA Incompatibilities in Indians*. Transfus Med Hemother, 2023. **50**(1): p. 30-38.
120. Wolff, J., et al., *Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms*. Blood, 2003. **102**(2): p. 731-3.

121. Gohring, K., et al., *Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera*. Br J Haematol, 2004. **126**(2): p. 252-4.
122. Zheng, C., et al., *Dual role of CD177 + neutrophils in inflammatory bowel disease: a review*. J Transl Med, 2024. **22**(1): p. 813.
123. Hong, B.J., et al., *Successful stabilization of graphene oxide in electrolyte solutions: enhancement of biofunctionalization and cellular uptake*. ACS Nano, 2012. **6**(1): p. 63-73.
124. Miao, W., et al., *Image-guided synergistic photothermal therapy using photoresponsive imaging agent-loaded graphene-based nanosheets*. J Control Release, 2015. **211**: p. 28-36.
125. Lee, C.K., et al., *Biomimetic surface modification using synthetic oligopeptides for enhanced guided bone regeneration in beagles*. J Periodontol, 2012. **83**(1): p. 101-10.
126. Sreejalekshmi, K.G. and P.D. Nair, *Biomimeticity in tissue engineering scaffolds through synthetic peptide modifications-altering chemistry for enhanced biological response*. J Biomed Mater Res A, 2011. **96**(2): p. 477-91.
127. Shin, H., S. Jo, and A.G. Mikos, *Biomimetic materials for tissue engineering*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4353-64.
128. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2149-2154.
129. Isidro-Llobet, A., M. Alvarez, and F. Albericio, *Amino acid-protecting groups*. Chem Rev, 2009. **109**(6): p. 2455-504.
130. Kent, S.B., *Total chemical synthesis of proteins*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(2): p. 338-51.
131. Babic, I., et al., *SHPs-1 induces aggregation of Ba/F3 pro-B cells via an interaction with CD47*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3652-8.
132. Oldenborg, P.A., et al., *Role of CD47 as a marker of self on red blood cells*. Science, 2000. **288**(5473): p. 2051-4.

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Sebastian Temme, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank für die Unterstützung bei allen Projekten, deiner fachlichen Expertise, sowie deiner durchgehend positiven und motivierenden Art.

Ein großer Dank gilt auch Pascal Bouvain, der mir sowohl fachlich als auch praktisch jederzeit eine große Unterstützung war und immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso danke ich Uli Flögel für die Bereitstellung der Labore und Geräte des Instituts für Molekulare Kardiologie, die diese Arbeit in dieser Form erst ermöglicht haben. Und natürlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Auch meinen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden Patricia, Timo, Lisa, Georgina, Arthur, Fady und Shiwa möchte ich danken. Neben der gemeinsamen Arbeit im Labor haben vor allem die Gespräche zwischendurch und die gemeinsamen Abende außerhalb des Labors diese Zeit besonders gemacht. Über die Jahre seid ihr für mich nicht nur Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden, sondern auch echte Freunde geworden.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit stets unterstützt und begleitet haben. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, der mich während dieser Zeit immer unterstützt, aufgefangen und motiviert hat und ohne den vieles nicht möglich gewesen wäre.